



HAL
open science

Etudes des circuits de régulations des jasmonates dans l'adaptation du riz au stress environnementaux

Simon Ndecky

► **To cite this version:**

Simon Ndecky. Etudes des circuits de régulations des jasmonates dans l'adaptation du riz au stress environnementaux. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ066 . tel-04785147

HAL Id: tel-04785147

<https://theses.hal.science/tel-04785147v1>

Submitted on 15 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) – UPR2357 – CNRS

THÈSE présentée par :

Simon NDECKY

soutenue le : **06 octobre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Etude des circuits de régulation des jasmonates dans l'adaptation du Riz aux stress environnementaux

THÈSE dirigée par :

Dr Thierry HEITZ

Directeur de recherche, IBMP, université de Strasbourg

RAPPORTEUR INTERNE:

Dr Patrick ACHARD

Directeur de recherche, IBMP, université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES:

Dr Philippe REYMOND

Professeur, université de Lausanne (Suisse)

Dr Anne-Aliénor VERY

Directeur de recherche, IPSiM, Montpellier

INVITÉS:

Dr Michael RIEMANN

Scientific staff, KIT, Karlsruhe (Allemagne)

Dr Antony CHAMPION

Directeur de recherche, IRD, Montpellier

Remerciements

Par ces premiers mots du tapuscrit de ma thèse, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont pu contribuer à l'aboutissement de ce travail. Peut-être, pour être plus juste, je devrais citer nommément ces amis et éducateurs qui ont façonné la personne que je suis et qui m'ont armé de connaissances au cours de mon parcours scolaire et universitaire mais, « ku lim juum/desaal » comme on dit chez moi. Je parlerai des personnes qui ont été déterminantes pour l'orientation recherche que j'ai donnée à mon cursus en biologie et ceux qui ont rendu ces 4 années de travail sur ces projets très enrichissantes, aussi bien sur le plan scientifique que social.

J'adresserai un Grand merci à Dominique GAGLIARDI et Heike LANGE qui m'ont initié à la l'expérimentation au laboratoire et à la démarche scientifique. Vous avez su éveiller en moi une passion pour la recherche que je ne me connaissais pas. Grâce à vous, j'ai pu déjouer certains pronostiques qui voyaient l'étudiant, très minimaliste que j'étais, s'arrêter en Master. Je remercie surtout mon directeur de thèse Thierry HEITZ, qui m'a donné l'opportunité de travailler sur ces projets. Tu as su croire en moi malgré cette fameuse lettre de motivation. J'espère avoir comblé, à minima, les attentes que tu portais en moi. Travailler sous ton encadrement a été un réel plaisir sauf, peut-être, au moment de lire certains des commentaires et retours de correction... J'ai énormément appris avec toi. C'était le but d'ailleurs ! Les enseignements que je tire de ces quatre années de thèse vont au-delà de l'aspect scientifique. Je retiens de toi surtout un encadrant très pédagogue avec moi comme et avec tous les étudiants que j'ai vu passer. J'espère pouvoir un jour acquérir cette patience que tu as pour expliquer les choses. Tu seras très certainement une inspiration dans ma future carrière (scientifique/ou pas).

Un grand merci aussi à Michael RIEMANN pour sa disponibilité malgré ses multiples responsabilités au KIT. *Michael, you made major parts of these achievements possible through the financial (Bayer fellowship, DAAD...) and technical supports you have found. Thanks for all the nice people you involved in the project namely Noemi FLUBACHER, Seyma BALKAN, Nitin PAWAR... It was a real pleasure to work with all of them. You offered me the chance to meet this cosmopolitan scientific community of Peter Nick's lab. Thank you also for our usual coffee (I owe you money for this ☺) time, talking for long time about scientific and non-scientific topics. I hope one day to be such a good manager as you are.* Je remercie également Antony CHAMPION, mon troisième encadrant dans cette thèse, avec qui j'ai, certes, le moins travaillé mais son implication dans le projet a eu un apport conséquent dans les travaux réalisés, notamment pour la production des mutants de Riz. Merci d'avoir rendu très facile mon passage à l'IRD de Montpellier. Je n'oublierai pas de remercier, à Montpellier, mes deux formateurs à la transformation de Riz : Sophie CHERON et Daniel MOUKOUANGA, le grand frère. Cette organisation tripartite de la thèse a rendu ces 4 années très riches en rencontres.

Les 6 années passées à l'IBMP ont également été marquées par de très belles rencontres et beaucoup d'échanges anecdotiques qui ont, sans doute, donné cette orientation à mes travaux. Je citerai par exemple cette discussion, d'un dimanche après-midi, avec Vianney qui, après avoir partagé sur ces projets intéressants, m'a recommandé quelques outils et astuces de clonage qui ont finalement rendu possible la réalisation de certaines expériences capitales de ma thèse. Des échanges de ce type, il y en a eu par dizaines, chacun avec son importance particulière. Merci à tous ces collègues des plateformes et des équipes de l'IBMP. J'ai une reconnaissance particulière pour les membres de mon équipe particulièrement pour Rozenn MENARD, enseignante devenue collègue. Merci pour tous tes conseils, Rozenn. Je ne remercierai jamais assez Valentin MARQUIS pour son accueil dans cette équipe, le lègue de protocoles (crucial) et les discussions super intéressantes, même après ton départ du bureau. Val, je te remercie également d'avoir « cédé » ta place de bureau à Ludivine, la meilleure collègue de bureau. Très souvent absente de la pièce malheureusement, mais ta compagnie fut des meilleures durant ces 6 années. C'est une chance que tu aies décidé de fuir le calme et la fraîcheur du nouveau bâtiment pour t'installer au 519. Le vécu de ces 6 ans à l'IBMP n'aurait été aussi agréable sans mes éternels collègues et acolytes du midi et d'autres moments que je me garderai de citer. Denisa, Philippe (et Mathou), merci pour ces beaux moments passés et ceux à venir.

Pour la réalisation de ces travaux, le cadre scientifique a été essentiel mais je dois préciser l'importance capitale de l'énergie positive que je tire du monde extérieure au labo qui m'a permis d'affronter les difficultés rencontrées dans ce travail. A tous ces amis, frères et sœurs, merci d'avoir été là. Merci à toute la famille Sainte-Anne, plus particulièrement à ma « grande sœur » Anne Marie, ma « jumelle » Yane, l'ainé Théo et mes deux fidèles partenaires Xavi et Francesca. Merci à la famille MALOU, ma famille adoptive de Strasbourg. Une reconnaissance particulière pour mes amis alsaciens (ou pas) que je nommerai les « ex fidèles à mon ex du lundi soir ». Vous vous reconnaitrez. Toute ma gratitude envers mes « colocataires » pour votre très précieuse compagnie et les conseils du Grand Joseph. A la famille 04, « le BOSS » vous a bien représenté à Strasbourg. Merci, à cette belle Dame de Nice, de Monaco ou encore d'Oussouye qui sait, dès fois mieux que moi-même, ce que je vaudrais et ce que je veux et qui m'aide à rester focaliser sur l'essentiel. Merci Anne ! Merci à toute ma Famille, depuis le Sénégal, depuis Oissel, Lille, ou encore Paris. Vos prières et messages d'encouragements ont su me mener au bout de cette première expérience professionnelle. *Anoumbaaran* !! Par la grâce de Dieu, on continuera à cheminer ensemble pour d'autres aventures toujours avec cette solidarité remarquable qui nous lie.

Pour finir, j'aimerais remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Table des matières

Chapitre I: introduction generale	1
A. Le Riz, ressource alimentaire et modèle de recherche pour l'étude des céréales.....	3
1. Culture et rendement sensibles aux stress abiotiques.....	4
2. Culture et rendement sensibles aux stress biotiques	4
3. Introduction du Riz comme modèle de recherche, pour une meilleure compréhension et une exploitation efficiente des stratégies d'adaptation.....	5
B. Les circuits de régulation des JAs caractérisés chez le Riz.....	7
1. La Biosynthèse du JA-Ile	7
2. La signalisation JA-Ile.....	11
3. Catabolisme des JAs.....	15
C. Rôles biologiques des JAs chez le Riz	18
1. Rôle dans le développement.....	19
2. Rôle dans l'adaptation aux stress biotiques.....	23
3. Rôle dans l'adaptation aux stress abiotiques	24
D. Les objectifs de la thèse.....	27
Chapitre II: Exploration de l'activité JA Oxydase (JAO) chez le Riz	29
A. Introduction	30
1. L'oxydation du JA, un moyen de contrôle du flux hormonal chez Arabidopsis et le Tabac	30
2. Les acteurs enzymatiques de la voie JAO	30
3. Rôle physiologique de la voie JAO	34
4. Objectifs de l'étude	36
B. Résultats.....	38
1. Caractérisation des enzymes « JA Oxydases » chez le Riz.....	38
2. Profils d'expression des gènes <i>OsJAOs</i>	50
3. Production de mutants ko pour les gènes <i>OsJAOs</i> par édition du génome	52

4.	Détermination du rôle physiologique de la voie JAO chez le Riz	64
5.	Les mutations <i>jaoQ</i> et <i>aoc</i> induisent des phénotypes antagonistes.....	76
C.	Discussion.....	79
1.	Le Riz possède une voie JAO fonctionnelle	79
2.	L'inactivation des JAOs modifie l'homéostasie des JAs dans les feuilles de Riz non stimulées	80
3.	L'inactivation incrémentale des JAOs induit des variations transcriptionnels et métaboliques	81
4.	Une hiérarchie des JAOs pour l'atténuation de la signalisation JA chez le Riz ?.....	82
5.	La voie JAO, un levier de régulation de la croissance et des réponses JAs dépendantes .	82
6.	Aspects évolutifs de l'apparition de la voie JAO	84
Chapitre III: Caracterisation de la composantes JAs-dependantes de la reponse au sel		87
A.	Introduction	88
1.	Les composantes du stress salin et leurs incidences sur les plantes.....	88
2.	Le Riz, une plante parmi les plus sensibles au stress salin.....	90
3.	Les mécanismes de tolérance au stress salin	92
4.	Le rôle des JAs dans la régulation des mécanismes de tolérance.....	97
5.	Objectifs du projet	99
B.	Résultats.....	99
1.	Mis au point du protocole d'application du stress salin	100
2.	Manuscrit Ndecky et al. 2022.....	106
3.	Analyse comparative du métabolome des plantes WT et <i>aoc</i> après stress salin	151
4.	La mutation <i>jaoQ</i> accentue les symptômes induits par le sel chez le WT	153
5.	En terre comme en hydroponie, le WT plus sensible à la toxicité du Na ⁺ que les <i>aoc</i> ...	155
C.	Discussion.....	157
1.	Dynamiques d'activation différentes de la synthèse des JAs dans les racines et les feuilles	157
2.	l'analyse transcriptomique révèle la complexité de la composante JA-dépendante de la réponse au sel	158

3. D'autres marqueurs moléculaires JAs-dépendants de la tolérance au sel révélés par l'analyse métabolique non-ciblée	160
4. La dualité de l'action des JAs sur la tolérance au sel confirmée en terre et chez le mutant <i>jaoQ</i>	161
Chapitre IV: Conclusions et perspectives	162
La voie JAO chez le Riz, régulatrice de la signalisation JAs et de réponses JAs-dépendantes	163
Les JAs, à la fois répresseurs et activateurs d'aspects différents de la tolérance au sel.....	165
Chapitre V: Matériel et méthodes	167
1. Les différents génotypes de plantes utilisés et leurs conditions de culture	169
2. Assemblage des constructions plasmidiques :.....	171
3. Transformation génétique des plantes	181
4. Le génotypage des mutants CRISPR-Cas9	185
5. Test de l'activité JA Oxidase <i>in vitro</i>	188
6. Analyses des séquences protéiques	189
7. Analyse métabolomique non ciblée	190
8. Analyses statistiques.....	191
9. Nomenclature variants protéiques exprimés chez les mutants <i>jaos</i>	192
10. Méthodes décrites dans le manuscrit Ndecky et al. (chapitre III)	192
Bibliographie	196

Table des illustrations

Figure I.1 : Représentation schématique de différents types de stress biotiques et abiotiques susceptibles d'affecter l'intégrité, la croissance et la fertilité du Riz.....	2
Figure I.2 : Les étapes enzymatiques de la biosynthèse de l'hormone active JA-Ile.....	6
Figure I.3 : Mécanisme d'activation de la signalisation JAs.....	10
Figure I.4 : Les principales voies cataboliques de JA et JA-Ile.....	14
Figure I.5 : Exemples de phénotypes illustrant l'importance des JAs dans la régulation de processus développementaux.....	20
Figure I.6 : Exemple de stress biotiques impliquant une fonction des JAs.....	22
Figure I.7 : Exemples de stress abiotiques impliquant une fonction des JAs.....	26
Figure II.1 : Représentation des acides aminés de liaison au co-substrat 2-OG, au cofacteur Fe ²⁺ (a) et au substrat JA (b) sur la structure tridimensionnelle de la protéine AtJAO2 d'Arabidopsis.....	31
Figure II.2 : Réaction générique d'oxydation par les 2-ODDs de leur substrat (S).....	31
Figure II.3 : Mécanisme consensuel du fonctionnement de la voie de catabolisme JAO chez Arabidopsis.....	33
Figure II.4 : Arbre phylogénétique regroupant les JAOs d'Arabidopsis et du Tabac et des 2-ODDs proches retrouvées chez différentes espèces de plantes terrestres.....	37
Figure II.5 : Arbre phylogénétique des protéines proches des JAOs, FLS et ANS d'Arabidopsis extraits de l'arbre de la figure II.4.....	39
Figure II.6 : Alignement des séquences des protéines « JAO-Like » avec celles des protéines FLS et ANS/LDOX et leur potentiels orthologues.....	40
Figure II.7 : Immunoblot des protéines recombinantes OsJAO* (6xHis ou HMBP) utilisées pour les tests d'activité « JA Oxidase » <i>in vitro</i>	41
Figure II.8 : Test de l'activité « JA-Oxidase » des 4 candidats OsJAOs réalisés <i>in vitro</i>	43
Figure II.9 : Résultats des expériences de complémentation, chez le mutant <i>atjao2-2</i> d'Arabidopsis, de la fonction de AtJAO2 par les JAOs de Riz.....	45
Figure II.10 : Comparaison du phénotype (floraison, stature des plantes et couleur des feuilles) de plantes d'Arabidopsis Col-0 (WT), <i>atjao2-2</i> et de mutants <i>atjao2-2</i> surexprimant les protéines OsJAOs.....	47
Figure II.11 : Profil d'expression des 4 gènes codant pour les JAOs de Riz.....	49
Figure II.12 : Constructions plasmidiques CRISPR-Cas9 utilisées pour la production des mutants <i>jaos</i> et la position des séquences ciblées par chacun des ARN guides (sgRNAs) sur les gènes <i>OsJAOs</i>	51
Figure II.13 : Synthèse des différentes étapes expérimentales ayant mené à la production de mutants <i>jao</i> stables et dépourvus de l'ADN-T codant la machinerie CRISPR-Cas9 (« Cas9-free »).....	53
Figure II.14 : Représentation des mutations (indel) identifiées sur les gènes <i>OsJAOs</i> des différentes lignées mutantes en génération T1 et les protéines potentiellement codées par ces gènes.....	57

Figure II.15 : Alignement des séquences protéiques des OsJAOs natives avec celles de leurs variantes mutées potentiellement exprimées dans les mutants générés.	58
Figure II.16 : Résultats des expériences de complémentation, chez le mutant <i>atjao2-2</i> d'Arabidopsis, de la fonction de AtJAO2 par les protéines mutées OsJAO2:p.K155del, OsJAO3:p.61PD>H et OsJAO3:p.DG62del.	59
Figure II.17 : Vérification de l'absence du T-DNA codant la machinerie CRISPR-Cas9 chez les mutants <i>jao</i> de la génération T1.	61
Figure II.18 : Analyse du profil des JAs dans les feuilles de plantes sauvages (WT) et des mutants <i>jao</i> de la génération T3.	65
Figure II.19 : Analyse de l'expression de marqueurs de signalisation JAs (<i>JAZ9</i> et <i>MYC2</i>) et de marqueurs de défense JA-dépendants (<i>LIS</i> , <i>RBB12-2</i> et <i>TPS30</i>) dans les feuilles de plantes sauvages (WT) et des mutants <i>jao</i> . .	67
Figure II.20 : Analyse en composantes principales (ACP) de la distribution du métabolome des feuilles des plantes WT et des mutants <i>jaos</i>	69
Figure II.21 : illustration de l'abondance des composés identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS sur les feuilles des plantes WT et des mutants <i>jao</i>	72
Figure II.22 : Comparaison du phénotype développemental de la partie aérienne des mutants <i>jaos</i> et de plantes WT âgés de 4 semaines.	73
Figure II.23 : Comparaison de l'élongation du mésocotyle de plantules de Riz WT, <i>aoc</i> et <i>jaoQ</i> après 4 jours de germination des graines à l'obscurité.	75
Figure II.24 : Comparaison de la sensibilité des plantes sauvages (WT) et des mutants <i>aoc</i> et <i>jaoQ(-B3 #249)</i> à la sécheresse.	77
Figure III.1 : Les altérations physiologiques et les symptômes induits par les composantes osmotique et ionique du stress salin chez les plantes. Figure adaptée de Horie et al. (2012).	89
Figure III.2 : Chronologie de la mise en place des composantes osmotique et ionique du stress salin chez les plantes.	89
Figure III.3 : Les principaux mécanismes d'adaptation au stress salin chez les plantes.	91
Figure III.4 : Phénotype de plantules sauvages (WT) exposées à des solutions salines à concentrations de NaCl différentes.	101
Figure III.5 : Impact de l'humidité relative de l'environnement de culture des plantules de Riz sur leur croissance et les symptômes induits par l'application du stress.	102
Figure III.6 : Phénotype de plantules sauvages (WT) et de mutants déficients en JAs (<i>aoc</i>) exposés à des solutions salines à concentrations de NaCl différentes.	103
Figure III.7 : Impact du pouvoir tampon du milieu de culture et de la stabilité du pH sur l'apparition de la nécrose sur les feuilles 2 des plantules WT et <i>aoc</i> exposées ou pas au stress salin.	105
Figure III.8 : Volcano plots illustrant l'abondance différentielle des composés identifiés par LC-HRMS dans les feuilles et racines du WT avant et après stress salin et entre le mutant <i>aoc</i> et le WT après stress salin.	150
Figure III.9 : Analyse en composantes principales (ACP) de la distribution du métabolome des feuilles et racines des plantules WT et <i>aoc</i> exposées ou pas au stress salin.	150

Figure III.10 : Heatmap illustrant l'abondance différentielle des composés annotés parmi ceux identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS dans les feuilles (a) et racines (b) des plantules WT et <i>aoc</i> après 4 jours de stress salin.....	152
Figure III.11 : Phénotype de plantules WT, de mutants <i>aoc</i> et de mutants <i>jaoQ</i> soumis à un stress salin.	154
Figure III.12 : Phénotype de plantes WT et de mutants <i>aoc</i> cultivés puis soumis à un stress salin en terre.....	156
Figure V.1 : Les différents systèmes de culture de Riz utilisés.	168
Figure V.2 : Vecteurs d'expression utilisés pour l'expression des protéines OsJAOs fusionnées à l'étiquette eGFP chez le mutant <i>atjao2-2</i> d'Arabidopsis.	172
Figure V.3 : Figure V.3 : Vecteurs d'expression utilisés pour l'expression des protéines OsJAOs fusionnées aux étiquettes 6xHis ou 6xHis-MBP dans les bactéries <i>E. coli</i>	174
Figure V.4 : Constructions plasmidiques utilisées pour l'expression de l'enzyme Cas9 et des sgRNAs chez le Riz pour la production des mutants <i>jaos</i>	176
Figure V.5 : Procédé d'assemblage de la séquence polycistronique de sgRNAs dans le plasmide pENTR4:sgRNAs-Multiplex.	178
Figure V.6 : Chronologie des étapes de transformation génétique du Riz.....	180
Figure V.7 : Génotypage par la méthode HRM du site de mutation du gène <i>OsJAO4</i> d'une plante sauvage et deux mutants de Riz.	186

Annexes

Annexe II-1 : Volcano plots illustrant les composés différentiels entre les mutants et le WT parmi les composés identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS sur les feuilles des plantes.....	85
Annexe II-2 : Comparaison du phénotype (floraison, stature des plantes et couleur des feuilles) de plantes d'Arabidopsis Col-0 (WT), <i>atjao2-2</i> et de mutants <i>atjao2-2</i> surexprimant les protéines OsJAO4 native (<i>atjao2-2_OE-OsJAO4</i>) et OsJAO4:p.308T>S (<i>atjao2-2_OE-OsJAO4S</i>) en génération T1.	86
Annexe V-1 : Liste des amorces utilisées.....	193
Annexe V-2 : Liste des amorces utilisées (suite).....	194
Annexe V-3 : Annotation des différentes feuilles d'une plantule de Riz âgées de 13 jours.....	195

Illustrations Ndecky et al. 2022 :

FIGURE 1 . JA-deficient young rice plants exhibit milder symptoms than their wild-type (WT) counterparts..	115
FIGURE 2 . Kinetic analysis of jasmonate profile in rice seedlings submitted to 100 mM NaCl stress	116
FIGURE 3 . Transcriptome analysis of WT and <i>aoc</i> seedlings before and after salt stress..	117
FIGURE 4 . Comparative analysis of expression dynamics of genes encoding transcription factors (TFs) in WT and <i>aoc</i> roots (a) and 2 nd leaf (b).	119
FIGURE 5 . Kinetic Gene Ontology (GO) display of DEGs in roots (a) and 2 nd leaf (b) upon salt stress.	121

FIGURE 6. Analysis of ABA pathway genes, hormone content and water management responses upon salt stress in rice.....	123
FIGURE 7. Analysis of differential ion transporter gene expression and ion accumulation in roots and leaves upon salt stress.....	125
FIGURE 8. Analysis of reactive oxygen species-scavenging systems in leaves under salt stress..	127
FIGURE 9. Jasmonate deficiency delays induction of senescence-promoting genes upon salt stress..	129
FIGURE 10. Proposed model of JAs-regulated functions in the rice response to salt stress.....	135
FIGURE S1. Developmental phenotypes of rice wild-type (WT) and jasmonate-deficient (<i>aoc</i>) seedlings exposed to control or 100 mM NaCl (salt) solutions.	136
FIGURE S2. Principal component analysis (PCA) of RNAseq data distribution..	137
FIGURE S3. Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes (DEGs).....	138
FIGURE S4. Kinetic expression profile of rice class III peroxidase genes displayed as heatmaps	139
FIGURE S5. Kinetic expression profile of rice ion transporter genes displayed as heatmaps in root (a) and 2 nd leaf (b).	140
FIGURE S6. Kinetic expression profile of rice genes encoding ROS-scavenging or –consuming activities displayed as heatmaps in root (a) and 2 nd leaf (b) of <i>aoc</i> and WT plants.....	141
FIGURE S7. Kinetic expression profile of rice genes identified as probable targets of JA signaling upon salt stress..	142
TABLE S 1. Lists of selected pathway genes that were screened for salt- and JA-regulated expression. (excel file)	143
TABLE S 2. Matrix of differential expression for genes encoding rice transcription factors (TFs) taking in account organ, salt impact (down or up), genotype (WT or <i>aoc</i>) and timing. The table can be filtered for specific expression profiles to retrieve TFs acting in peculiar conditions. (excel file)	143
TABLE S 3. Primers used	143
TABLE S 4. Global gene expression table in WT and <i>aoc</i> rice seedlings upon salt stress. Time points 0 h, 1 h, 6 h, 72 h post-salt application are shown. Different sheets display salt vs control or mutant vs WT changes for root or 2nd leaf expression. (excel file)	143

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
11-HPHT	Acide 11(S)-hydroperoxy-hexa-decatriénoïque
11OH-JA	11-hydroxy-JA
12COOH-JA	12-carboxy-JA
12COOH-JA-Ile	12-carboxy-JA-Ile
12-HSO ₄ -JA	Acide 12-hydroxyjasmonic sulfate
12-O-Glc-JA	Acide 12-O-glucospyranosyl-jasmonique
12OH-JA	12-hydroxy-JA
12OH-JA-Ile	12-hydroxy-JA-Ile
13-HPOT	13-hydroperoxyoctadeca-9,11,15-triénoïque
13-LOX	13-lipoxygénase
2-ODD - 2-OGD	2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygénases
2-OG	Oxoglutarate
4,5-ddh-JA	4,5-didéhydro-JA
6xHis	6 x Histidine
A	
ABA	Acide abscissique
Abm	<i>Antibiotic biosynthesis monooxygenase</i>
ACX	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
ADN-T	ADN de transfert
AH	<i>Amido-hydrolase</i>
Ala	Alanine
ANA	Acide naphthalèneacétique (auxines)
ANS	<i>Anthocyanidines synthase</i>
AOC	<i>Allène oxyde cyclase</i>
AOS	<i>Allène oxyde synthase</i>
APX	<i>Ascorbate peroxidase</i>
Arg	Arginine
ARN - RNA	Acide ribonucléique
ARNg	ARN guides
ARNt - tRNA	ARN de transfert
B	
BAP	6-benzylaminopurine (cytokinines)
bHLH	Basic Helix-Loop-helix
BPH	Brown planthopper
BRs	Brassinostéroïdes
BSA	Bovine serum albumin
C	
C3H10	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 10</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>

CAT	Catalase
CBF	<i>CCAAT motif-binding factor</i>
cDNA	ADN complémentaire
CERES	<i>Cereal root systems</i>
CFA	Acide coronafacique
CHX	<i>Cation/proton exchanger</i>
CKs	Cytokinines
COI	<i>Coronatine insensitive</i>
Col-0	Columbia
CPA	<i>Cation/proton antiporter</i>
<i>cpm2</i>	Coleoptile photomorphogenesis 2
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
CYP	Cytochromes P450
D	
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DC	<i>Differential compounds</i>
DEG	<i>Differentially expressed genes</i>
DHN	<i>Dehydrin</i>
DIADÉ	Diversité, adaptation, développement des plantes
DIS	<i>Dark induced senescence</i>
dn-OPDA	Acide 2,3-dinor-12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic
DREB1	<i>Dehydration-responsive element-binding protein 1</i>
dS m ⁻¹	DeciSiemens par mètre
DSBH	<i>Double-stranded β-helix</i>
DTT	Dithiothréitol
DW	<i>Dry weight</i>
E	
EC	<i>Electrical conductivity</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EG	<i>Extra glume</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ERF	<i>Ethylene response factor</i>
EXP	<i>Expansin</i>
F	
F	FoodDB
FAO	<i>Food and agricultural organization</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FLS	<i>Flavonol synthases</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FSD	<i>Fe-dependent superoxide dismutase</i>
FT - TF	facteur de transcription
fw	<i>Forward (primer)</i>
FW	<i>Fresh weight</i>

G	
GA	Gibbérellines
GG	Golden gate
GH3	<i>Glycoside hydrolase 3</i>
GIPC	Glycosyl inositol phosphorylceramide
GNPS	<i>Global natural product social molecular networking</i>
GO	Gene ontology
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
gsw	<i>Leaf stomatal conductance</i>
H	
ha	Hectare
HAK	<i>High affinity K⁺ uptake</i>
HI-LOX	<i>Herbivore-induced type 2 13-LOX</i>
HKT	<i>High affinity potassium</i>
HRM	<i>High resolution melt</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HtA	Hexadécatriénoïque
hygro ^R	<i>Hygromycin resistance</i>
HyPRPs	<i>Hybrid prolin-rich proteins</i>
IBMP	Institut de biologie moléculaire des plantes
I	
ICE	<i>Inducer of CBF expression</i>
ICE-synthego	<i>Inference of CRISPR Edits - synthego</i>
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry</i>
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRD	Institut de recherche pour le développement
IRRI	<i>International rice research institute</i>
J	
JA	Acide jasmonique
JA-aa	JA-acide aminé
JA-Ala	Jasmonoyl-Alanine
JA-Ile	Jasmonoyl-Isoleucine
JA-Leu	Jasmonoyl-Leucine
JA-Met	Jasmonoyl-Methionine
JAO	<i>Jasmonic acid oxidase</i>
JOX	<i>Jasmonate-induced oxygenase</i>
JAR	<i>Jasmonate resistant</i>
JAs	Jasmonates
JATI	<i>JA-triggered immunity</i>
JA-Val	Jasmonoyl-Valine
JAZ	<i>Jasmonate zim domain</i>
JID	<i>JAZ interacting domain</i>
JMT	<i>Jasmonic acid carboxyl methyltransferase</i>

K	
K	KNApSack
Kan ^R	<i>Kanamycin resistance</i>
KAT	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>
KEG	<i>Keep on going</i>
KIT	<i>Karlsruhe institute of technology</i>
ko	<i>knock-out</i>
KT	<i>K⁺ transport</i>
KUP	<i>K⁺ uptake</i>
L	
LC-HRMS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDOX	<i>Leucocyanidin oxygenase</i>
LeA	acide α -linoléinique
LERa	<i>Laboratory for environmental and raw materials analysis</i>
log ₂ FC	Log ₂ fold change
Lp _r	Conductivité hydraulique racinaire
Lys	Lysine
M	
MAP kinase	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MED25	<i>Mediator complex subunit 25</i>
MeJA	Methyl jasmonate
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
MFP	Multifunctional protein
milieu AB	Milieu de culture d'Agrobacterium
MJE	<i>Methyl jasmonate esterase</i>
MS	Murashige and Skoog
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
N	
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis stock center</i>
NB (medium)	N6/B5
NB-S	NB sélection
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NCED	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>
NHX	<i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>
NINJA	<i>New interactor of JAZ</i>
NOMT	<i>Naringenin 7-O-methyltransferase</i>
NPTII	<i>Neomycin phosphotransferase II</i>
NRT	<i>Nitrate transporter</i>
NSCC	<i>Non-selective cationic channels</i>
O	
OPC-8	Acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque

OPCL	<i>OPC-8 coenzyme A ligase</i>
OPDA	12-oxo-10,15(Z)-phytodienoïque
OPR	<i>OPDA reductase</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OsSLR1	<i>Rice slender rice 1</i>
P	
p35S	<i>Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter</i>
pb	Paire de base
PC	PlantCyc
PCA - ACP	Analyse en composante principale
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	PhenolExplorer
PEG 6000	Polyethylene glycol 6000
PG-A1	Prostaglandin A1
PHYB	Phytochrome B
PIP	<i>Plasma membrane intrinsic protein</i>
PLA/GL	<i>phospho/galacto-lipases</i>
PLA1	<i>Phospholipase A1</i>
POD	<i>peroxidase</i>
PR	<i>Pathogenesis-related</i>
PRN	Pré-régénération
Pro	Proline
Q-R	
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
QTOF	<i>Quadupole time-of-flight</i>
RAB	<i>Responsive to ABA</i>
RBOH	<i>Respiratory burst oxidase homologues</i>
RBSDV	<i>Rice black-streaked dwarf virus</i>
RCI-1	<i>Rice chemically induced cDNA 1</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RMN	<i>Nuclear magnetic resonance (spectroscopy)</i>
RN	Régénération
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RRSV	<i>Rice ragged stunt virus</i>
RSS3	<i>Rice salt sensitive 3</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
R-type	<i>Rapid-transient type of anion channel</i>
rv	<i>Reverse (primer)</i>
RWC	<i>Relative water content</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
S	
SA	acide salicylique
SAG	<i>Senescence associated gene</i>

SCF complex	<i>Skp, cullin, F-box containing complex</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
sgRNA - ARNg	<i>Single guide RNA - ARN guide</i>
SLs	Strigolactones
SOD	<i>Superoxide dismutases</i>
SOS1/2/3	<i>Salt overly sensitive 1/2/3</i>
ST2a	<i>Sulfotransferase 2a</i>
S-type	<i>Slow-activating sustained type of anion channel</i>
T	
TCP21	Teosinte branched/ Cycloidea/PCF 21
TIP	<i>Tonoplast intrinsic protein</i>
TPI	<i>Trypsin protease inhibitor</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating CRISPR RNA</i>
tRNA ^{gly}	<i>tRNA glycine</i>
Trp	Tryptophane
tukey's HSD	<i>Tukey's honestly significant difference</i>
TW	<i>Turgescence weight</i>
U	
U6p1	<i>U6 promoter 1</i>
U6p2	<i>U6 promoter 2</i>
ucgl	<i>Unclosed glume</i>
UGT	<i>UDP-dependent glycosyltransferases</i>
UPLC-MS/MS	<i>Ultraperformance liquid chromatography - MS/MS</i>
V-Z	
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>
VTE3	<i>Vitamin E deficient 3</i>
WT	<i>Wild type</i>
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>
ZFP182	<i>Zinc finger protein 182</i>

Chapitre I:

INTRODUCTION GENERALE

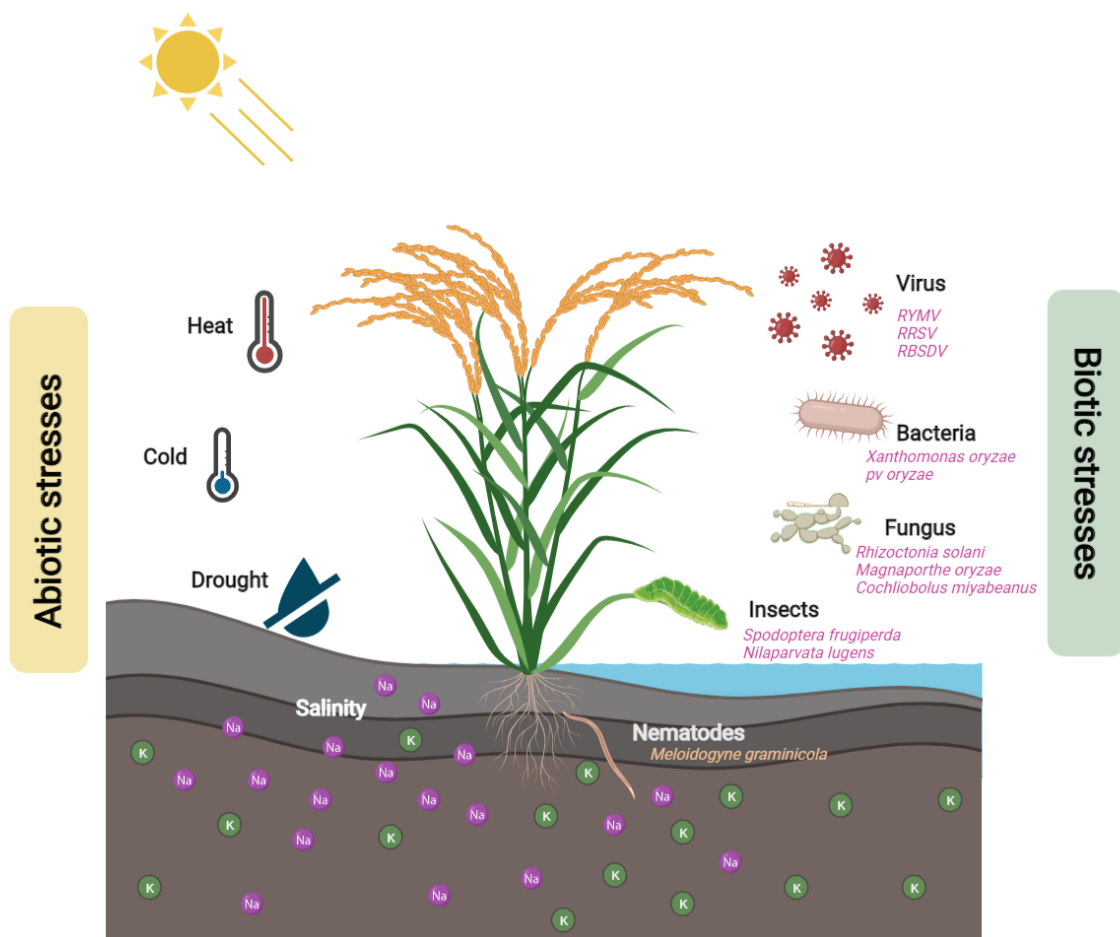


Figure I.1 : Représentation schématique de différents types de stress biotiques et abiotiques susceptibles d'affecter l'intégrité, la croissance et la fertilité du Riz.

Les résultats présentés et discutés dans ce manuscrit sont le fruit de 4 années de recherches sur deux projets scientifiques qui s'intéressent aux mécanismes de régulation des Jasmonates (JAs) et leurs fonctions chez la plante modèle *Oryza sativa*. Les travaux ayant conduit à ces données ont été réalisés dans trois laboratoires de recherche différents, situés en France et en Allemagne. Ils ont principalement été encadrés par le Dr Thierry Heitz (IBMP, Strasbourg), directeur de la Thèse, et les deux partenaires externes que sont le Dr Antony Champion (IRD, Montpellier) et le Dr Michael Riemann (KIT, Karlsruhe). Sur les deux projets de la thèse, ces trois chercheurs qui collaboraient depuis déjà plusieurs années sur divers projets s'intéressant au rôle des JAs, ont décidé de mettre à contribution leurs expertises dans le métabolisme et la signalisation de l'hormone Jasmonate, la transformation génétique du Riz et la physiologie du stress chez le Riz. Ceci dans le but de caractériser une voie de catabolisme du JA non encore décrite chez le Riz et mettre en lumière la composante JAs-dépendante dans la réponse du Riz au stress salin.

A. Le Riz, ressource alimentaire et modèle de recherche pour l'étude des céréales

Le Riz est avant tout une denrée alimentaire utilisée comme l'aliment de base dans de vastes régions du monde, en particulier en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud. Il constitue avec le blé, la céréale la plus consommée par l'homme. Chaque année, un peu plus de 400 millions de tonnes de Riz sont produites dans le monde, provenant des 160 millions d'hectares (ha) de terres dédiées à cette culture (Agriculture, 2022). Bien qu'ayant connu des progressions significatives, la production mondiale de Riz peine toujours à couvrir la forte demande qui ne cesse d'augmenter, avec la croissance de la population mondiale (FAO, 2022; Agriculture, 2022). Cela s'illustre en général par les fluctuations des prix qui affectent bien plus souvent les grands importateurs de Riz en Afrique et en Amérique du Sud, où elles créent une insécurité alimentaire du fait de l'inaccessibilité du Riz à tous. Les Nations Unies se sont d'ailleurs fixé parmi les « Objectifs de développement durable » (ODDs) d'éliminer la faim dans le monde et assurer la sécurité alimentaire pour tous, entre autres, par l'augmentation de la productivité agricole (Assembly, 2015). Concernant le Riz, cela nécessiterait d'augmenter les terres cultivées et/ou d'améliorer les rendements sur les terres déjà exploitées. La première solution est moins accessible puisque les terres arables deviennent de plus en plus limitantes avec l'augmentation des populations. De plus, l'élargissement des terres irait à l'encontre de l'urgence mondiale de préserver les écosystèmes et de protéger la biodiversité. La solution résiderait plutôt dans l'amélioration des rendements qui, d'après une étude récente sur 32 systèmes de cultures, n'atteindraient que 57 % de leur potentiel (Yuan et al., 2021). D'après cette même étude, ce gap entre le rendement potentiel et la production actuelle est dû, sur une majorité de ces terres, à une utilisation encore peu efficace des ressources requises pour la culture du Riz mais aussi et surtout à l'impact négatif des stress environnementaux (Figure I.1). De plus, la production mondiale de Riz est également connue pour être très sensible aux attaques de différents pathogènes et ravageurs (Figure I.1).

1. Culture et rendement sensibles aux stress abiotiques

La culture et la productivité du Riz sont très sensibles aux variations des conditions de son environnement, notamment à celles de lumière, de température mais surtout d'hygrométrie. Avec 75% de production mondiale provenant des terres irriguées (*paddy lowland areas*) (Toriyama et al., 2005), le Riz est une des plantes cultivées qui consomme le plus d'eau, générant d'ailleurs des rendements plus faibles que le maïs et le blé pour le même volume d'eau (Foley et al., 2020). Le Riz serait d'ailleurs la culture vivrière avec l'empreinte sur les pénuries d'eau mondiale (*Water scarcity footprint*) la plus importante (Odegard et al., 2015). C'est au niveau des terres à culture pluviale (40% des terres) que la production de Riz est la plus sensible aux variations de l'hygrométrie (Nguyen, 2005). Les retards ou les raréfactions des pluies sur ces terres favorisent à long terme des sécheresses sévères capables de causer un échec total des récoltes. L'excédent d'eau apporté par de fortes pluies est quant à lui capable de causer l'inondation des terres en basses altitudes et la submersion des plantes souvent mortelle au-delà d'une quinzaine de jours (Nguyen, 2005). La salinité des sols est une autre cause majeure de la déprivation d'eau. Elle correspond à une présence excessive de sels solubles tels que le CaCl_2 , le NaHCO_3 et le NaCl (ce dernier étant le plus soluble et le plus répandu) dans le sol, lui conférant une conductivité électrique (EC) supérieure ou égale à 4 dS m^{-1} (deciSiemens par mètre). De ce fait, elle favorise, en plus de la privation d'eau, une accumulation d'ions Na^+ (ou Cl^-) à des niveaux toxiques, capables de causer la dégénérescence des feuilles et la mort des plantes (Munns and Tester, 2008). La salinité des sols concerne plus de 900 millions d'ha de terres dans le monde avec comme causes principales, des facteurs naturels comme l'intrusion d'eau marine et des facteurs humains comme la pratique intensive de l'irrigation. Le Riz est particulièrement concerné par cette problématique. D'abord, parce qu'il est majoritairement produit sur des terres irriguées (Toriyama et al., 2005). De plus, le Riz figure parmi les céréales les plus sensibles au sel, avec des rendements affectés dès $1,9 \text{ dS m}^{-1}$ d'EC du sol (Grattan et al., 2002; Shannon, 1997). Le développement et la sélection de variétés de Riz tolérantes au stress salin sont d'ailleurs une priorité pour les chercheurs et les agronomes. La sécheresse et la salinité des sols sont certes les principaux stress abiotiques pouvant affecter la production de Riz mais cette dernière est également sensible à d'autres contraintes climatiques telles que les fortes variations de température dont les effets sont largement décrits dans diverses revues scientifiques (Nguyen, 2005; Fahad et al., 2018).

2. Culture et rendement sensibles aux stress biotiques

La culture du Riz est également très sensible à l'attaque des pathogènes de différents types (Figure I.1). En 1985 déjà, une revue sur les maladies du Riz avait répertorié près de 80 pathogènes et ravageurs dont des champignons, des bactéries, des virus, des nématodes et des insectes, certains causant plus de dommages que d'autres (Ou, 1985). En étudiant l'impact des maladies sur les cultures de blé, de Riz, de maïs, de pomme de terre et de soja, Savary et al ont estimé les pertes globales dues aux ravageurs et

pathogènes à 30% pour le Riz entre 2010 et 2014 (Savary et al., 2019). Ces pertes varient toutefois d'une région à une autre et selon la nature de l'agresseur. Celles causées par le champignon *Rhizoctonia solani*, responsable du « *Sheath blight* », sont globalement plus importantes et sont de 8,75%, 7,06% et 6,78% respectivement en Chine, dans le sud-est de l'Asie et en Afrique sub-saharienne. Les deux autres maladies fongiques les plus dévastatrices sont le « Blast » (*Magnaporthe grisea*) et le « Brown spot » (*Cochliobolus miyabeanus*) qui causent près de 6% de perte de rendement dans le Sud-Est de l'Asie et dans la plaine indo-gangétique. Parmi les bactéries, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*), responsable du « Bacterial blight » est celle qui cause le plus de dommages, induisant 8,51% de pertes en IGP. L'infection virale « Rice Yellow Mottle Virus » (RYMV) et le « Stem borer » dû à des larves d'insectes sont également responsables de dégâts importants en Afrique sub-saharienne (4.33% de perte) et en Chine (8,75% de perte). Ce sont donc les effets cumulés de chacun de ces pathogènes et ravageurs sur la production de Riz qui rend leurs impacts aussi importants sur les rendements.

3. Introduction du Riz comme modèle de recherche, pour une meilleure compréhension et une exploitation efficiente des stratégies d'adaptation

Du fait de l'effet de ces stress biotiques et abiotiques, la culture de Riz est perpétuellement animée par une volonté d'optimiser les rendements pour pouvoir couvrir les demandes nutritionnelles des humains. Ces travaux d'optimisation ont démarré depuis bien des siècles, pendant la période néolithique, où les premiers agriculteurs avaient entrepris la domestication de Riz sauvages pour la création de nouvelles espèces à forte productivité (Buckler IV et al., 2001). Cela s'est exclusivement fait par des croisements génétiques entre espèces néo-domestiquées et espèces de Riz sauvages pour l'introgession de caractères bénéfiques à la production. Ces pratiques sont perpétuées jusqu'au jour d'aujourd'hui et ne s'intéressent plus seulement à l'augmentation du rendement. En effet, Elles visent également à améliorer la qualité des grains de Riz, et à développer des variétés de Riz exploitables sur des terres auparavant peu propices et moins sensibles aux stress biotiques et abiotiques cités plus haut. De nos jours, il existe une large collection de Riz sauvages et domestiqués, à caractéristiques bien définies, répertoriée dans les *genebanks* de l'IRRI (132000 accessions ; <https://www.irri.org/international-rice-genebank>), de Africa Rice (22000 accessions ; <http://rice-biodiversity-center.890m.com/>) et de Oryzabase (22000 accessions ; <https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/center/list>). Le séquençage complet du génome du cultivar Nipponbare (*O. sativa ssp. japonica*), terminé et publié en 2005 (Matsumoto et al., 2005), a également contribué aux travaux d'amélioration des Riz domestiqués. Il a notamment permis de mettre en lumière un bon nombre de gènes et marqueurs moléculaires responsables des caractères associés à certaines des variétés de Riz existantes. L'identification du transporteur de Na⁺ HKT1;8/SKC1 comme responsable de la tolérance au stress salin du cultivar Nona Bokra (*O. sativa ssp. indica*), en est d'ailleurs un exemple (Ren et al., 2005). L'annotation du génome de Riz a aussi permis à la recherche sur le Riz de bénéficier du savoir établi chez d'autres plantes modèles tels que *Arabidopsis thaliana*, par un transfert des

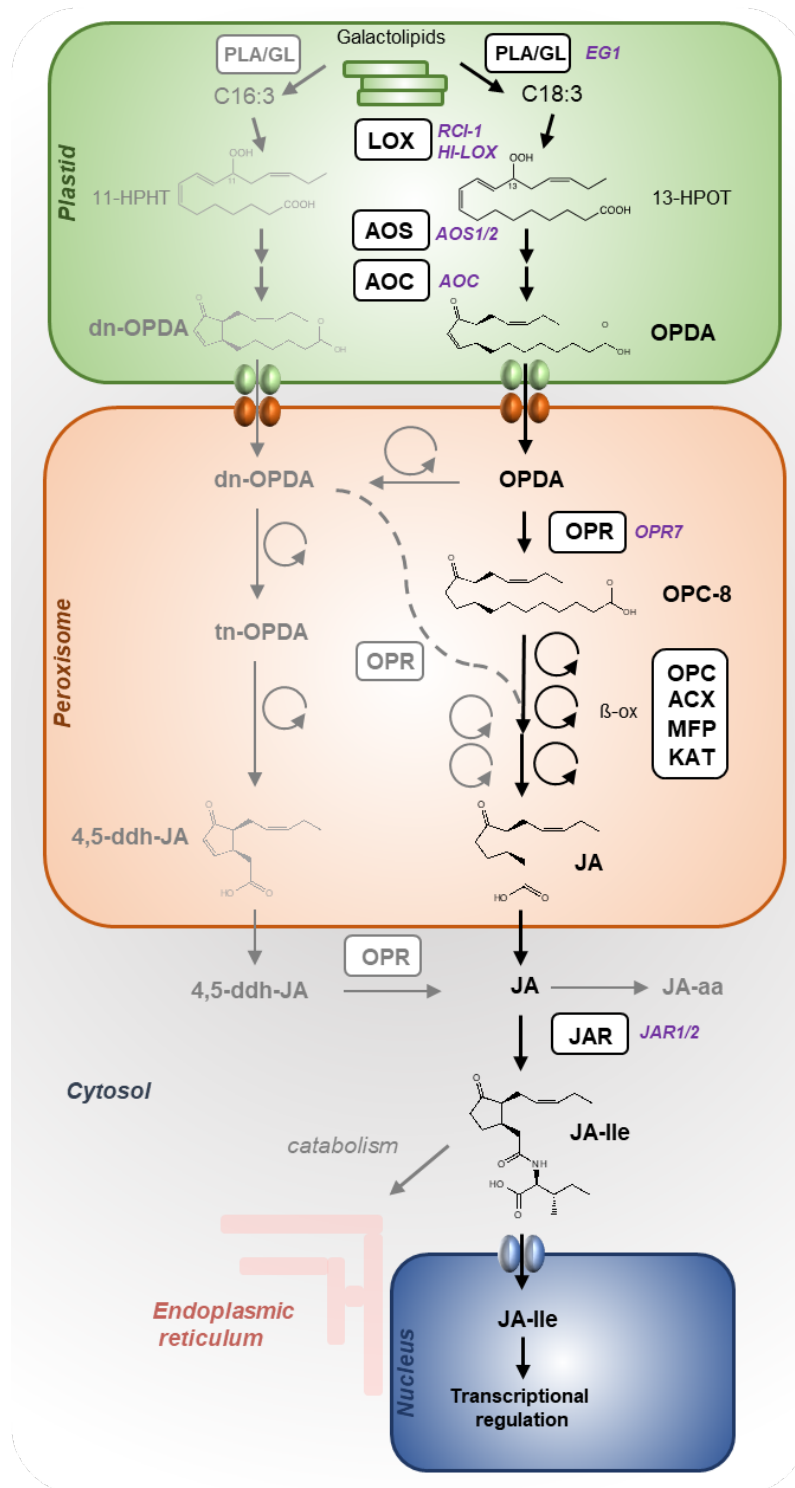


Figure I.2 : Les étapes enzymatiques de la biosynthèse de l'hormone active JA-Ile.

Dans les (chloro)plastides, l'acide α -linoléique (LeA ; 18:3) libéré par l'action des Phospho/galactolipases est métabolisé successivement par les enzymes 13-LOX, AOS et AOC pour former de l'OPDA qui est transporté ensuite dans le péroxysome. L'OPDA y est réduit par une OPDA REDUCTASE (OPR) en OPC-8 qui subit trois cycles de β -oxydation pour former le JA. C'est dans le cytosol que le JA est conjugué par une JAR avec l'acide aminé Isoleucine pour former le JA-Ile, la principale hormone active. La voie alternative de formation du JA-Ile utilise comme premier substrat, de l'acide hexadécatriénoïque (HtA ; 16:3) convertit en dn-OPDA dans les plastides. Ce dnOPDA, une fois dans le peroxyssome, peut soit être réduit par une OPR et subir deux cycles de β -oxydation pour former du JA, soit subir directement deux cycles de β -oxydation pour former du 4,5-ddh-JA. Dans le cytosol, le 4,5-ddh-JA est d'abord réduit par une OPR cytosolique en JA avant que celui-ci ne soit convertit en JA-Ile par une JAR. En violet : les gènes codant les enzymes de biosynthèse des JAs identifiées chez le Riz. Figure adaptée de Heitz 2021

connaissances (Rensink and Buell, 2004). Ainsi, de par les avancées déjà effectuées dans la recherche sur le Riz et de par la taille relativement petite de son génome, le Riz est maintenant érigé comme une plante modèle de recherche, pour l'étude de problématiques bien plus spécifiques au Riz et aux autres céréales alimentaires. De plus, l'avènement des nouvelles approches omiques (transcriptomique, protéomique, métabolomique...), ces dernières années, a permis d'enrichir les connaissances établies chez le Riz et permet une description plus spécifique du fonctionnement de divers processus biologiques, notamment celui des hormones telles que les Jasmonates, qui régulent le développement des plantes et les interactions avec leur environnement.

B. Les circuits de régulation des JAs caractérisés chez le Riz

Les Jasmonates (JAs) sont parmi les phytohormones les plus connues et dont les fonctions régulées au sein des plantes sont les mieux caractérisées de nos jours (Howe et al., 2018). Ils ont été découverts en premier chez *Jasminum grandiflorum* (jasmin) comme le composé odorifère de l'essence de jasmin, qui leur a inspiré leur nom de «Jasmonates » (Demole et al., 1962). Présents principalement chez les plantes et chez quelques champignons (Miersch et al., 1993), les JAs ont d'abord été définis comme des inhibiteurs de croissance des plantes puis comme des hormones de défense contre les insectes herbivores, puis les pathogènes microbiens, en particulier les nécrotrophes. Ces dernières années, le rôle, le métabolisme et le mécanisme d'action des JAs ont été amplement étudiés chez différentes espèces de plantes (Campos et al., 2014; Wasternack and Hause, 2013; Heitz et al., 2019; Wasternack and Song, 2017). Ces études ont montré que les JAs forment une famille très diversifiée de composés, pas tous actifs, avec des fonctions très versatiles allant du contrôle du développement des plantes à la régulation de leurs réponses aux stress biotiques et abiotiques auxquels elles font face. Ces découvertes ont été principalement faites chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* et *Solanum lycopersicum*, espèces utilisées pendant longtemps comme modèles de recherche en biologie végétale. L'introduction plus récente du Riz comme modèle de recherche des céréales a permis de faire des avancées notables quant au fonctionnement des JAs chez le Riz et d'identifier les principaux acteurs protéiques impliqués dans cette voie hormonale (Figures I.2-4 & Tableau I.1).

1. La Biosynthèse du JA-Ile

Les JAs sont dérivés d'acides gras qui sont successivement métabolisés par une batterie d'enzymes pour la formation des différents composés JAs connus. Chez les plantes vasculaires, la forme conjuguée avec l'acide aminé Isoleucine, le Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), est identifiée comme la principale hormone active (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). Le modèle de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA), précurseur direct du JA-Ile, avait été proposé par Vick et Zimmerman en 1983 (Vick and Zimmerman, 1983). Il aura fallu un peu plus de trois décennies de recherches intensives pour que les principales

enzymes impliquées dans la biosynthèse des JAs soient identifiées et caractérisées (Schaller and Stintzi, 2009). Cette voie biosynthétique se partage entre plusieurs compartiments cellulaires avec des étapes successives dans les (chloro)plastides, les péroxysomes et le cytosol (Wasternack and Hause, 2013) (Figure I.2).

a. Formation dans les chloroplastes de l'OPDA, le 1^{er} jasmonate

La synthèse des JAs est initiée par le clivage de galactolipides, très abondants dans les membranes chloroplastiques et thylakoïdiennes. Cette réaction est catalysée par des phospho/galacto-lipases de type 1 (PLA/GL) qui libèrent de l'acide α -linoléique (LeA ; 18:3), essentiellement à partir des galactolipides (Wasternack and Hause, 2013) (Figure I.2). Weber et al. (1997) ont démontré, chez *Arabidopsis*, l'existence d'une voie alternative qui utilise de l'acide hexadécatriénoïque (HtA ; 16:3) comme premier substrat dans les plastides (Weber et al., 1997). LeA et HtA vont donner naissance à des composés différents bien que métabolisés par les mêmes enzymes, du fait de la différence de longueur de leur chaîne carbonée (Wasternack and Hause, 2013). L'hydroperoxydation de LeA sur son carbone 13 par une *13-LIPOXYGENASE* (13-LOX) produit de l'acide 13-hydroperoxyoctadeca-9,11,15-trienoïque (13-HPOT). Le groupement hydroxyperoxyde du 13-HPOT est déshydraté par le cytochrome P450 CYP74A (AOS) pour produire de l'allène oxyde, un intermédiaire de biosynthèse instable. Celui-ci est converti en acide 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoïque (OPDA), le premier jasmonate, par l'action enzymatique d'une *ALLENE OXYDE CYCLASE* (AOC). Le HtA est également métabolisé par les enzymes 13-LOX, AOS et AOC pour produire successivement de l'acide 11(S)-hydroperoxy-hexa-décatriénoïque (11-HPHT) et de l'acide 2,3-dinor-12-oxo-10,15(Z)-phytodienoïque (dn-OPDA). Toutes les étapes du métabolisme de LeA et HtA en OPDA et dn-OPDA se produisent exclusivement dans les plastides où sont localisées toutes les enzymes impliquées (Wasternack and Hause, 2013; Wasternack and Strnad, 2018). Chez le Riz, comme chez *Arabidopsis*, on soupçonne plusieurs PLA₁ (Phospholipase A1) d'agir de manière redondante pour la libération de LeA des galactolipides (Ellinger et al., 2010; Ishiguro et al., 2001). *EG1 (EXTRA GLUME 1)* est la seule PLA₁ identifiée à ce jour chez le Riz et semble être principalement impliquée dans la synthèse de JA pour la régulation du développement des organes reproducteurs (Cai et al., 2014). L'expression de *EG1* n'est pas affectée par la blessure mais les mutants *egl* présentent une malformation de l'épillet que l'on attribue à une réduction des niveaux de JAs, d'au moins deux fois, comparés à ceux des plantes sauvages. Une analyse phylogénétique des LOX codées par le génome du Riz révèle l'existence de deux 13-LOX nommées RCI-1 (*RICE CHEMICALLY INDUCED CDNA 1*) et HI-LOX (*HERBIVORE-INDUCED TYPE 2 13-LOX*), toutes deux impliquées dans la biosynthèse des JAs (Zhou et al., 2009; Liao et al., 2022). L'inactivation de HI-LOX réduit les teneurs en JAs et affaiblit les réponses de défense JA-dépendantes lors d'une attaque par l'insecte « Brown Planthopper » (BPH), alors que la surexpression de RCI-1 augmente les niveaux de JAs et la réponse JA-dépendante contre le même insecte (Zhou et al., 2009). Deux protéines AOS (AOS1 et AOS2) sont codées par le génome du Riz mais seule

AOS1 possède un signal d'adressage vers les chloroplastes (Haga and Iino, 2004; Kuroda et al., 2005). Cependant, le mutant *cpm1*, knock-out pour le gène *AOS1*, est partiellement déficient en JAs (Haga et al., 2008; Biswas et al., 2003), alors que la surexpression de *AOS2* chez le Riz augmente les niveaux de JAs et améliore la résistance au champignon *Magnaporthe grisea* (Mei et al., 2006). Il serait bien intéressant de voir les niveaux de JAs chez un mutant double *aos1/2* pour déterminer s'il existe une réelle redondance dans la fonction de ces enzymes. L'enzyme AOC est la seule parmi les enzymes de biosynthèses des JAs qui existe en simple copie chez le Riz (Riemann et al., 2013). Les mutants *cpm2*, *hebiba* et *aoc*, tous ko pour le gène *AOC*, sont d'ailleurs préférentiellement utilisés pour l'étude de l'importance des JAs dans différents processus biologiques du fait de leur déficience totale en JAs (Riemann et al., 2003, 2013; Nguyen et al., 2019a).

b. Formation dans le peroxyosome du JA, le précurseur direct de l'hormone active

La synthèse des JAs, initiée dans les chloroplastes, se poursuit dans les peroxyosomes après l'export du dn-OPDA et de l'OPDA. Dans ce nouveau compartiment, les deux composés empruntent des circuits métaboliques bien différents (Wasternack and Hause, 2013; Wasternack and Strnad, 2018). L'OPDA peut directement être converti en dn-OPDA, à chaîne carbonée plus courte, via un cycle de β -oxydation faisant intervenir successivement quatre type d'enzymes : une *OPC-8 COENZYME A LIGASE* (OPCL), *ACYL-CoA OXIDASE* (ACX), une *MULTIFUNCTIONAL PROTEIN* (MFP) et *3-KETOACYL-CoA THIOLASE* (KAT) (Figure I.2). L'OPDA peut également être réduit en acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentényle)-cyclopentane-1-octanoïque (OPC-8) par une *OPDA REDUCTASE* (OPR). Ce processus est considéré comme la voie métabolique principale qui mène à la biosynthèse du JA. L'OPC-8 formé subit, par la suite, trois cycles de β -oxydation qui raccourcissent la chaîne carbonée pour former de l'acide (+)-7-iso-jasmonique communément nommé JA (Schaller and Stintzi, 2009). Cependant, le dn-OPDA néosynthétisé et celui provenant des chloroplastes peuvent être métabolisés dans le peroxyosome sans l'action d'une OPR. Il a été récemment montré chez le mutant *opr3* d'Arabidopsis que l'inactivation de OPR3, la seule OPR d'Arabidopsis réduisant l'OPDA en OPC-8, n'abolit pas totalement la synthèse de JA (Chini et al., 2018). En effet, chez ce mutant, le dn-OPDA subit un premier cycle de β -oxydation pour former du tétranor-OPDA (tn-OPDA) puis un deuxième pour former du 4,5-didehydrojasmonate (4,5-ddh-JA), précurseur direct du JA (Figure I.2). Chez le Riz, cette voie biosynthétique mineure via la formation de 4,5-ddh-JA n'a pas encore été démontrée. Toutefois, chez le mutant *ucgl* (« unclosed glume ») du Riz, l'inactivation de OPR7, le plus proche homologue de AtOPR3 d'Arabidopsis, cause seulement une réduction partielle des teneurs en JAs (Tani et al., 2008; Liao et al., 2014). Cela suggère l'existence d'une voie alternative de production du JA, soit grâce à une autre OPR peroxyosomale, soit via la production de 4,5-ddh-JA. Chez le Riz, en plus du 4,5-ddh-JA, les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la β -oxydation de OPC-8 en JA restent encore à être identifiées.

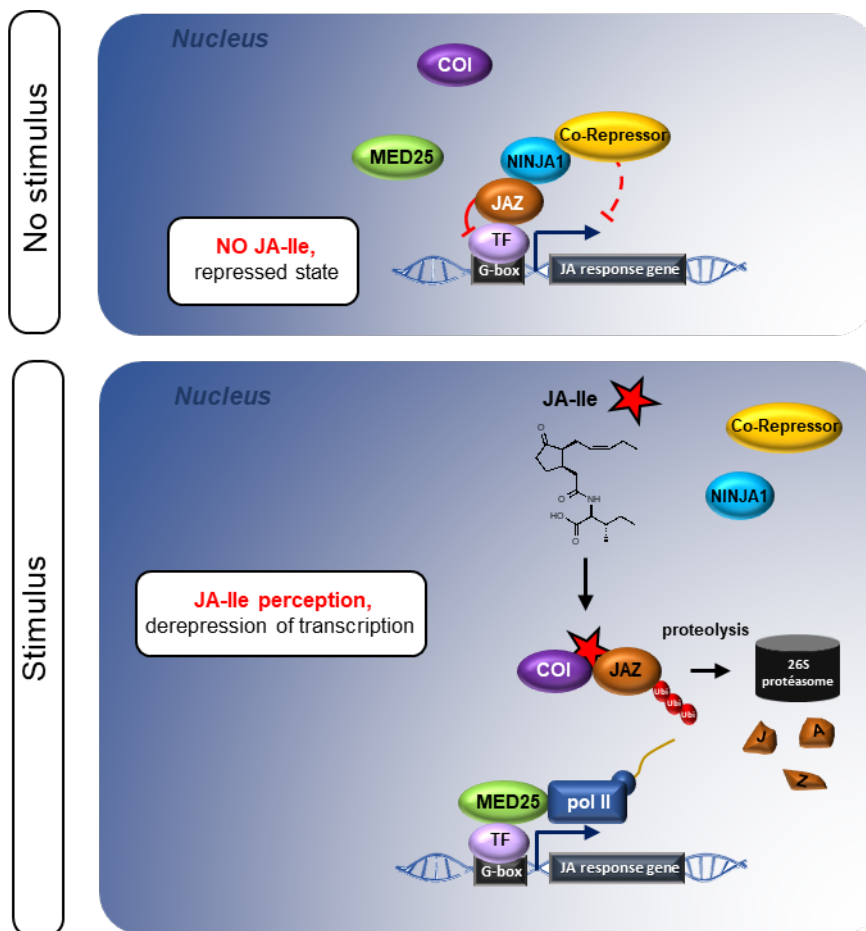


Figure I.3 : **Mécanisme d'activation de la signalisation JAs.**

En l'absence de stimulus induisant la synthèse des JAs, les répresseurs JAZs, par l'intermédiaire de NINJA1, recrutent d'autres corépresseurs et ensemble se lient et répriment les facteurs de transcription (tels que les bHLH) qui régulent l'expression des gènes de réponses aux JAs. Lorsque la biosynthèse des JAs est induite par un stimulus interne ou externe à la plante, le JA-Ile s'accumule et se lie alors aux corécepteurs JAZ et COI. Les JAZs sont alors ubiquitinés et dégradés via le protéasome. La dégradation des JAZs entraîne la dérèpression de l'activité des facteurs de transcription qui par l'intermédiaire de MED25 recrute la polymérase II pour la transcription des gènes de réponses aux JAs.

c. Formation de l'hormone active JA-Ile dans le cytosol

Enfin, les étapes ultimes de la biosynthèse de JA-Ile prennent place dans le cytosol où le JA et le 4,5-ddh-JA, formés dans le peroxyosome, sont transportés via un mécanisme encore non élucidé. Chez *Arabidopsis*, le 4,5-ddh-JA est réduit par OPR2 pour former du JA. La conjugaison du JA avec l'acide aminé Isoleucine (Ile) pour former le JA-Ile, est catalysée par des enzymes à fonction *ACYL ACID-AMIDO SYNTHETASES*, ayant une forte affinité pour le JA, et appartenant au groupe I des enzymes de type GH3 (*GLYCOSIDE HYDROLASE 3*) (Staswick et al., 1992, 2002; Suza et al., 2010; Kang et al., 2006). Ces enzymes catalysent également la conjugaison du JA avec plusieurs autres acides aminés (aa) (Svyatyna et al., 2014; Staswick and Tiriyaki, 2004). Une analyse des analogues structuraux des JA-aa, synthétisés chimiquement en couplant l'acide coronafacique (CFA) à chacun des 20 acides aminés, a montré que JA-Leu, JA-Val, JA-Ala et le JA-Met sont également bioactifs (Yan et al., 2016). JA-Ile reste tout de même le conjugué à plus forte affinité pour le récepteur AtCOI1 et le plus abondant dans les feuilles des plantes avant et après induction de la biosynthèse des JAs par une blessure. Cela fait donc de JA-Ile la principale hormone active parmi les JAs. Chez le Riz, les protéines JAR1 et JAR2 sont les seules GH3 du groupe I exprimées et capables de catalyser la formation de JA-Ile (Riemann et al., 2008; Wakuta et al., 2011). Ces deux protéines semblent toutefois exercer des fonctions redondantes chez le Riz, puisque l'inactivation de JAR1 chez le mutant *jar1* provoque certes une malformation de l'épillet, mais pas une stérilité mâle comme le mutant déficient en JA *aoc*. La présence de JAR2 permettrait donc de pallier l'absence de OsJAR1 et d'assurer la synthèse de JA-Ile requis pour la reproduction.

2. La signalisation JA-Ile

Le mécanisme d'activation de la signalisation JAs est très similaire aux modèles de signalisation décrits pour la plupart des phytohormones. En absence d'hormone, la signalisation est réprimée par une famille de répresseurs transcriptionnels spécifiques à chaque type d'hormone (Santner and Estelle, 2009). Lors de la perception du stimulus entraînant la synthèse de l'hormone, celle-ci induit la levée de la répression par l'élimination des répresseurs ce qui permet l'expression des gènes en réponse au stimulus perçu. La signalisation fonctionne donc par la dérèpression des gènes cibles (Figure I.3).

a. Les protéines ubiquitine E3 ligase COI, principaux corécepteurs du JA-Ile

Dans le cas des JAs, le JA-Ile est le ligand qui induit cette dérèpression par sa liaison à une protéine F-box COI, recrutée dans un complexe « SCF ubiquitine E3 ligase », SCF^{COI}. L'importance des protéines (*CORONATINE INSENSITIVE*) COI dans la signalisation JA-Ile a été relevée dans les années 1990, chez *Arabidopsis*, à la découverte d'un mutant *coi1* insensible à la Coronatine, une phytotoxine de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae*, et identifiée plus tard comme un analogue structural de JA-Ile (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Xie et al postulaient alors COI1 comme une protéine à F-box faisant

potentiellement partie d'une « E3 ubiquitine ligase » dans un complexe SCF^{COI}, agissant comme le récepteur de JA-Ile chez *Arabidopsis*. A la liaison de son ligand, celui-ci procéderait au recrutement, à l'ubiquitination et à la dégradation de répresseurs transcriptionnels de la réponse JA, restés longtemps inconnus.

b. Les répresseurs JAZ, les autres corécepteurs du JA-Ile

Une décennie plus tard, les protéines *JASMONATE-ZIM DOMAIN* (JAZ) ont été identifiées comme les principaux répresseurs transcriptionnels des réponses régulées par les JAs (Chini et al 2007, Thines et al 2007). Les JAZs sont, en effet, des protéines nucléaires dépourvues de domaines de liaison à l'ADN mais caractérisées par la présence sur leur séquence de deux domaines d'interaction protéique : le domaine ZIM (*ZINC FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM*) en N-terminal et le domaine Jas en C-terminal. En absence de JA-Ile, les JAZs, via leur domaine Jas, se lient principalement aux facteurs de transcription (FTs) de type basic Helix-Loop-helix (bHLH) et répriment l'interaction de ces derniers avec la protéine MED25, bloquant le recrutement de la Pol II et la transcription des gènes cibles. Via leur domaine ZIM, elles se lient aux adaptateurs NINJA (*NEW INTERACTOR OF JAZ*) qui recrutent d'autres répresseurs transcriptionnels du type TOPLESS (TPL) (Pauwels et al., 2010). L'activation de la biosynthèse des JAs, suite à un signal interne ou externe à la plante, favorise l'accumulation de JA-Ile et promeut l'assemblage des corécepteurs COI1-JAZ pour la dégradation des protéines JAZs via le protéasome. Par ce mécanisme, la répression de la transcription qu'exerçaient les JAZs et leurs partenaires est levée et les gènes sont activement transcrits et peuvent alors orchestrer la réponse au stimulus induit.

c. Les corécepteurs COI et JAZ chez le Riz

Chez le Riz, on trouve trois orthologues du corécepteur COI1 d'*Arabidopsis* nommés COI1a, COI1b et COI2. La séquence protéique de COI2 est plus distincte des séquences de COI1a et COI1b qui sont très proches avec 89% des résidus similaires (Lee et al., 2013). L'expression ectopique de OsCOI1a ou OsCOI1b chez le mutant *coil* d'*Arabidopsis* permet de rétablir la sensibilité aux JAs et la fertilité mâle également déficiente chez ce mutant *coil*. Au contraire, la protéine OsCOI2 est incapable de compléter la fonction de AtCOI1 bien que des interactions avec certaines OsJAZs en présence de JA-Ile aient été reportées (Lee et al., 2013). Parmi les trois OsCOI, COI1b est la plus exprimée dans les racines et les feuilles de Riz et interagit avec la plus large gamme de OsJAZs et d'une manière JA-Ile-dépendante. COI1b apparait alors comme le récepteur principal de JA-Ile qui contrôle la signalisation JAs chez le Riz. L'importance de COI1b est d'ailleurs soutenue par l'observation que l'inactivation de COI1b réduit le nombre de panicule et la fertilité de l'épillet chez le mutant *coilb* (Lee et al., 2015). Ce mutant n'est toutefois pas stérile comme le mutant *coil* d'*Arabidopsis*, suggérant l'implication d'au moins un des deux autres corécepteurs COI dans la signalisation JAs, requise pour la fertilité de l'épillet. Dhakarey et

al. (2016) relevaient d'ailleurs que la présence chez le Riz de ces trois protéines COI étroitement apparentées suggère que les mécanismes de perception du JA-Ile chez Arabidopsis peuvent différer de ceux du Riz. En effet, chez ce dernier, les affinités différentes entre COI et JAZ (Lee et al., 2013) pourraient servir de premier levier pour garantir la spécificité des réponses régulées par les JAs. Il serait alors pertinent d'étudier l'importance de chacun des trois corécepteurs OsCOI en produisant des mutants ko simples ou multiples pour les gènes respectifs.

Concernant les répresseurs JAZs, on en trouve 15 chez le Riz, tous caractérisés par la présence sur leur séquence des domaines d'interactions protéiques ZIM et Jas (Ye et al., 2009). Hormis OsJAZ14, tous les JAZ identifiés sont capables d'interagir *in vitro* avec le facteur de transcription MYC2 du Riz et d'inhiber potentiellement son activité transcriptionnelle *in vivo* (Uji et al., 2016). L'étude du mutant *extra-glume 2* (*eg2*) a d'ailleurs démontré que JAZ1 est bien un répresseur de la transcription des cibles de MYC2. Ce mutant *eg2* présente une substitution d'une Alanine en Glycine sur le domaine Jas de la protéine *JAZ1*, qui altère son interaction avec la protéine à F-box COI1b sans affecter sa liaison avec MYC2. Ainsi, l'incapacité de OsJAZ1 à être ubiquitinée et dégradée via le protéasome provoque une stérilité chez *eg2* due à une répression constitutive de MYC2 et à l'expression de ces cibles telles que MADS1 (Cai et al., 2014), un gène clé dans le développement de l'épillet (Chen et al., 2006). De plus, Il a récemment été montré que la répression de MYC2 par les JAZs chez le Riz est également médiée par la protéine OsSRO1a recrutée par les JAZs par l'intermédiaire de l'adaptateur OsNINJA1 (Kashihara et al., 2019).

d. La diversité des cibles des répresseurs JAZs

AtMYC2 et OsMYC2 sont loin d'être les seuls facteurs de transcription (FT) dont les activités transcriptionnelles sont réprimées par les JAZs. Chez Arabidopsis, Fernández-Calvo et al. (2011) ont montré que les deux proches orthologues de MYC2, MYC3 et MYC4, interagissent également avec plusieurs des JAZs d'Arabidopsis, *in vivo* et *in vitro*. Cette étude a surtout permis d'identifier le *JAZ INTERACTING DOMAIN* (JID) présent sur l'extrémité N-terminale des protéines MYCs et par lequel elles interagissent avec les répresseurs JAZs. Ce domaine JID est en effet retrouvé sur plusieurs autres FTs de la famille des bHLH dont certains ont une interaction déjà connue avec les protéines JAZs (Fernández-Calvo et al., 2011; Pauwels and Goossens, 2011). Cependant, certaines JAZs sont également capables d'interagir avec une variété de protéines dépourvues du domaine JID. Celle-ci inclut, par exemple, des FTs de type MYB tout comme d'autres régulateurs transcriptionnels des voies de signalisation Gibbérellines (GA) et éthylène (Fernández-Calvo et al., 2011). La répression de la protéine DELLA OsSLR1 par OsJAZ9 a été définie récemment comme un élément central dans l'antagonisme entre les JAs et les GAs (Um et al., 2018). On sait également chez Arabidopsis, que le cross-talk entre l'ABA et les JAs suppose, entre autres, l'interaction entre le répresseur AtJAZ12 et la protéine KEG, une

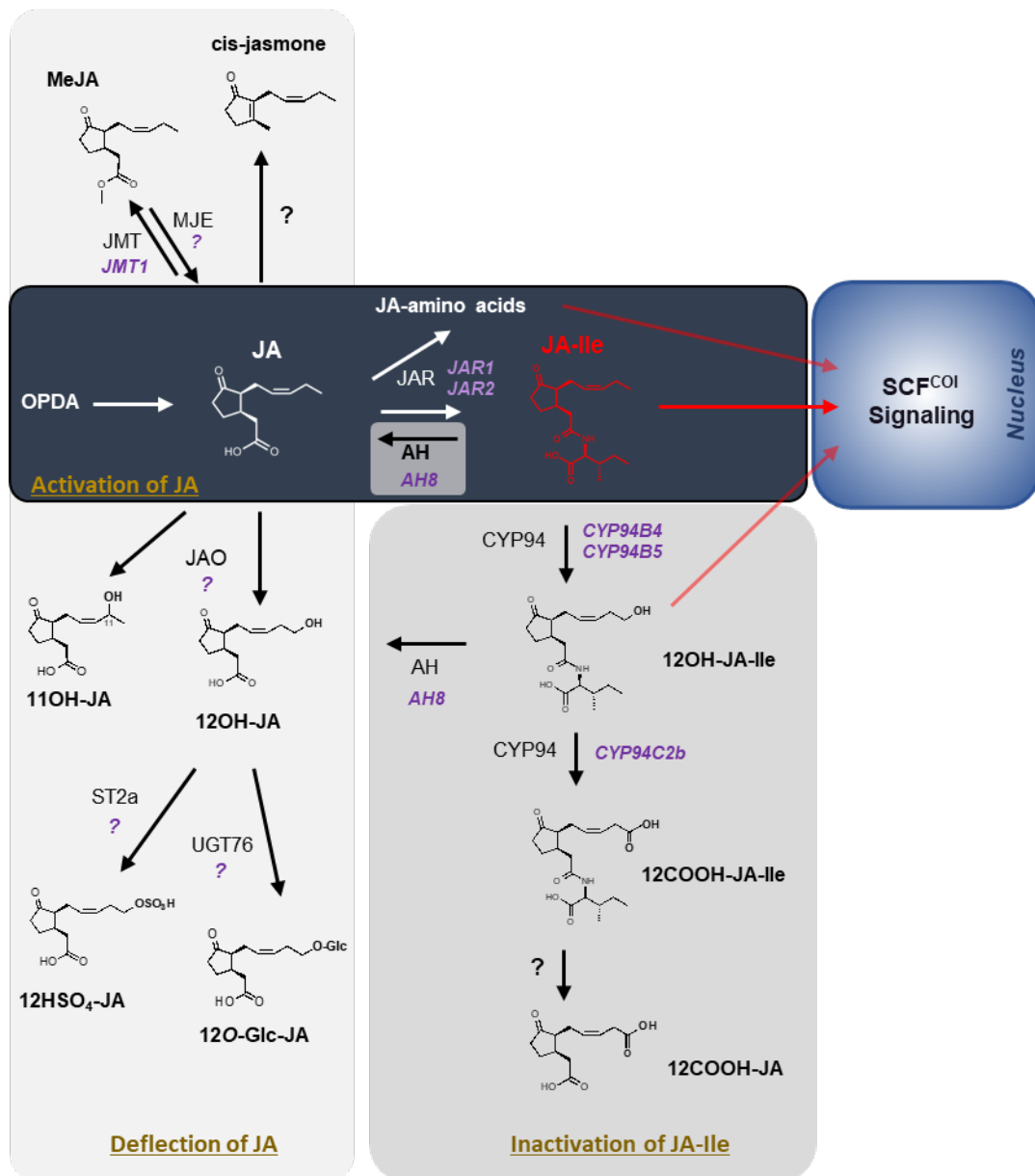


Figure I.4 : Les principales voies cataboliques de JA et JA-Ile.

D'une part on a le catabolisme par inactivation de JA-Ile, convertit en des dérivés à affinité faible, voire nulle pour les corécepteurs COI. Il implique l'oxydation de JA-Ile par des CYP94 de type B pour former du 12OH-JA-Ile (moins actif) qui est directement oxydé par des CYP94 de type C pour former du 12COOH-JA-Ile (plus stable mais inactif). Il implique également des AH qui catalysent la dé-conjugaison de l'acide aminé Isoleucine du JA-Ile et du 12OH-JA-Ile pour former respectivement du JA et du 12OH-JA. D'autre part, on a le catabolisme par diversion du flux de JA, convertit en dérivés méthylé ou oxydé. Le MeJA formé par une JMT peut être reconvertit en JA par une MJE. L'oxydation du JA est irréversible et donne de l'OH-JA dont la position (12 ou 11) du groupement hydroxyle reste à être définie. Le 12OH-JA formé à partir du 12OH-JA-Ile ou potentiellement du JA peut-être métabolisé en 12H₄S₄-JA et 12O-Glc-JA respectivement par une ST2a et une UGT76. les enzymes qui catalysent la formation du cis-jasmone et du 12COOH-JA ne sont pas encore identifiées bien que ces composés soient détectés dans les extraits de plantes. En violet : les gènes codant les enzymes du métabolisme des JAs identifiées chez le Riz

ubiquitine-3-ligase qui réprime le facteur de transcription ABI5 dans les réponses ABA. En l'absence d'ABA, la liaison de KEG à AtJAZ12 prévient sa dégradation via le protéasome et promeut par conséquent l'action répressive de AtJAZ12 sur la signalisation JAs (Pauwels et al., 2015). Ainsi, de par la diversité de leurs interactants, les JAZs apparaissent comme un hub via lequel les JAs régulent une myriade de réponses et par lequel les JAs interagissent avec d'autres phytohormones pour coordonner ces réponses.

3. Catabolisme des JAs

L'activation des JAs et leur perception dans les cellules végétales sont couplées à des mécanismes de catabolisme inductibles qui permettent de garder un contrôle étroit sur les niveaux des JAs, notamment de l'hormone active JA-Ile (Figure I.4). Ces voies métaboliques ont été extensivement étudiées dans mon laboratoire de thèse sur les plans biochimique, génétique et physiologique. Il est apparu que le niveau des activités cataboliques conditionne largement le contenu en JAs d'un tissu. En effet, les gènes impliqués dans ce catabolisme des JAs sont souvent faiblement exprimés et contribuent à maintenir une accumulation de JA-Ile et une signalisation résiduelle en l'absence de stimulus. L'expression de ces gènes est également régulée de façon positive par la signalisation JAs, lorsque celle-ci est induite. Cela permet aux plantes de garder un contrôle sur l'ampleur des réponses induites et de les atténuer rapidement lorsque celles-ci ne sont plus requises. Les gènes du catabolisme des JAs sont induits simultanément à l'activation transcriptionnelle de gènes de biosynthèse et des répresseurs JAZ et font donc partie du même régulon (Koo et al., 2011; Heitz et al., 2012). Les mécanismes de catabolisme des JAs décrits à ce jour peuvent être globalement regroupés en deux principales stratégies (Heitz et al., 2019). La première consiste en la désactivation de la principale hormone active, le JA-Ile, en des composés à affinité moindre ou nulle pour le récepteur COI, et donc dotés de faibles activités hormonales. La deuxième stratégie s'articule autour du JA, le précurseur du JA-Ile, qui peut être converti en d'autres composés par des enzymes qui constituent différentes voies possibles de déviation du pool de JA potentiellement utilisé pour la synthèse de JA-Ile.

a. Les voies d'inactivation du JA-Ile

L'hydroxylation du JA-Ile par des cytochromes P450 (CYP) membranaires est le premier mécanisme décrit pour le catabolisme du JA-Ile. Elle implique spécifiquement des CYP94, localisés dans le réticulum endoplasmique, dont les isoformes du sous-clade B catalysent la conversion de JA-Ile en 12OH-JA-Ile (Heitz et al., 2012; Koo et al., 2011, 2014; Kitaoka et al., 2011). La surexpression de CYP94B entraîne une suraccumulation de 12OH-JA-Ile, accompagnée de l'atténuation des réponses JAs, compatible avec une affinité moindre de 12OH-JA-Ile pour le récepteur COI démontrée *in vitro* (Aubert et al., 2015; Koo et al., 2011). Malgré cette faible affinité, il a été montré plus récemment que l'application externe de 12OH-JA-Ile est capable, tout comme le JA-Ile, d'induire les réponses JA-dépendantes chez *Arabidopsis*,

Process	Activity	Rice genes	Rice genetic material ko mutant - OE & RNAi lines	Phenotype associated	Reference
JA biosynthesis	Lipase	<i>EG1</i>	<i>eg1</i>	extra-glume	Cai et al., 2014
	13-LOX	<i>RCI-1</i> <i>HI-LOX</i>	<i>RNAi-HI-LOX</i> <i>OE-RCI</i>	sensitivity to BPH resistance to BPH	Zhou et al., 2009 Liao et al., 2022
	AOS	<i>AOS1</i> <i>AOS2</i>	<i>cpm1</i> -	photomorphogenesis -	Biswas et al., 2003 -
	AOC	<i>AOC</i>	<i>hebiba</i> , <i>cpm2</i> , <i>aoc</i>	photomorphogenesis, sterility, growth promotion, salt tolerance, sensitivity to osmotic stress	Riemann et al., 2003, 2013, Nguyen et al., 2020, Hazman et al., 2015, Tang et al., 2020
	OPR	<i>OPR7</i>	<i>ucgl</i>	unclosed glume	Liao et al., 2014
	β-oxidation	-	-	-	-
	JAR	<i>JAR1</i> <i>JAR2</i>	<i>jar1</i> -	photomorphogenesis -	Riemann et al., 2008 -
JA signaling	COI	<i>COI1a</i> <i>COI1b</i> <i>COI2</i>	<i>coi1b</i> <i>RNAi COI1a/COI1b</i> -	delay in senescence sensitivity to BPH -	lee et al., 2015 ye et al., 2012 -
	JAZ	<i>JAZ1</i>	<i>Jaz1</i> , <i>OE-JAZ1</i> <i>eg2 dominant mutant</i>	effect on drought tolerance Extra-glume	Fu et al., 2017 Cai et al., 2014
		<i>JAZ2</i>	-	-	Ye et al., 2009
		<i>JAZ3</i>	-	-	
		<i>JAZ4</i>	<i>OE-JAZ4</i> , <i>RNAi-JAZ4</i>	effect in the resistance to the virus RBSDV	He et al., 2020
		<i>JAZ5</i>	<i>OE-JAZ5</i>		
		<i>JAZ7</i>	<i>OE-JAZ7</i>	growth promotion	Hakata et al., 2012
		<i>JAZ10</i>	<i>OE-JAZ10</i>		
		<i>JAZ12</i>	<i>OE-JAZ12</i>		
		<i>JAZ6</i>	<i>OE-JAZ6</i>	extra-glume	Cao et al., 2021
		<i>JAZ8</i>	<i>OE-JAZ8</i>	-	Yamada et al., 2012
		<i>JAZ9</i>	<i>OE-JAZ9</i>	salt/osmotic stress tolerance	Ye et al., 2009
		<i>JAZ11</i>	<i>OE-JAZ11</i>	-	Pandey et al., 2021
<i>JAZ13</i>	<i>OE-JAZ13</i>	increased cell death	Feng et al., 2020		
<i>JAZ14</i>	-	-	-	Ye et al., 2009	
<i>JAZ15</i>	-	-	-		
MYC	<i>MYC2</i>	<i>OE-MYC2</i>	resistance against <i>Xoo</i>	Uji et al., 2016	
JA catabolism	CYP94	<i>CYP94B4</i>	-	-	Mao et al., 2020
		<i>CYP94B5</i>	-	-	Hazman et al., 2019
		<i>CYP94C2b</i>	<i>FE047 (OE-CYP94C2b)</i>	salt tolerance	Kurotani et al., 2015
	AH	<i>AH8</i>	-	-	Hazman et al., 2019
	JAO	-	-	-	-
MJE	<i>JMT1</i>	<i>OE-JMT1</i>	sensitivity to BPH	Qi et al., 2016	

Tableau I.1 : Liste des gènes de Riz codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse, la signalisation et le catabolisme des JAs.

Inclus dans ce tableau, les mutants ko, lignées RNAi et lignées surexprimeurs pour chacun des gènes identifiés ainsi que les phénotypes associées à ces plantes.

et cela via son interaction avec COI1 (Poudel et al., 2019; Jimenez-Aleman et al., 2019). Cependant, le 12OH-JA-Ile est peu abondant *in vivo* car directement converti par les CYP94C en 12COOH-JA-Ile, qui est plus stable et s'accumule à des niveaux plus importants. Le 12COOH-JA-Ile ne présente pour sa part aucune affinité pour le récepteur AtCOI1 et est incapable d'induire les réponses JA-dépendantes (Aubert et al., 2015). Chez le Riz, on connaît partiellement 3 CYP94 (CYP94C2b, CYP94B4 et CYP94B5 (Kurotani et al., 2015a; Hazman et al., 2019; Mao et al., 2019) impliqués dans la conversion du JA-Ile en ces formes oxydées, dont CYP94B3 et CYP94B4 qui catalysent toutes les deux la conversion de JA-Ile en 12OH-JA-Ile (Hazman et al., 2019; Mao et al., 2019). L'autre mécanisme de désactivation du JA-Ile se fait par la dé-conjugaison de l'acide aminé isoleucine pour reformer du JA (Figure I.4). Cette réaction est catalysée par des *AMIDO-HYDROLASES* (AH) également capables d'utiliser comme substrat le 12OH-JA-Ile, qu'elles transforment en 12OH-JA (Widemann et al., 2013). Certaines enzymes de cette famille sont bifonctionnelles car elles hydrolysent également des conjugués d'auxine (Zhang et al., 2016c). AH8 est la seule *AMIDO-HYDROLASE* de Riz caractérisée à ce jour pour son activité de dé-conjugaison de l'Isoleucine du JA-Ile et du 12OH-JA-Ile (Hazman et al., 2019).

b. Les voies de déviation du précurseur JA

Hormis sa conjugaison avec les acides aminés afin de former notamment le JA-Ile, le JA peut être métabolisé en bien d'autres composés méthylé, hydroxylé ou sulfaté... (Wasternack and Song, 2017; Heitz, 2021; Heitz et al., 2016). Durant les premières décennies de recherches sur le fonctionnement des JAs chez les plantes, certains de ces composés ont été associés à de potentielles fonctions biologiques mais la caractérisation du JA-Ile comme principale hormone active et la description de son mécanisme de perception a mené à la reconsidération de l'importance de ces autres dérivés du JA. C'est surtout leur incapacité à induire les réponses JA-dépendantes chez les mutants *jar1*, incapables de former le JA-Ile, et leur affinité quasi nulle pour les récepteurs COI qui ont invalidé l'hypothèse que ces dérivés du JA pouvaient activer la signalisation via le corécepteur COI-JAZ. Il n'est cependant pas inconnu que certains JAs agissent indépendamment de COI1, représentant notamment une forme de signalisation ancestrale basée sur la réactivité chimique de ces composés (Monte et al., 2020). Les travaux récents ont aussi montré que de nombreux dérivés de JAs sont en fait issus du catabolisme de JA-Ile. Ceci illustre la plasticité de la voie métabolique et les multiples façons de contrôler les niveaux de JA-Ile.

Le MeJA, un des premiers JAs identifiés, est un composé volatil formé par **méthylation du JA** par une *JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE* (JMT) (Seo et al., 2001). La surexpression du gène *OsJMT1* chez le Riz réduit l'accumulation de JA-Ile en réponse à l'herbivorie de l'insecte Brown Planthopper (BPH ; *Nilaparvata lugens*) et augmente par conséquent la sensibilité des plantes transgéniques à l'insecte (Qi et al., 2016). A l'opposé, il a été montré chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et chez *Achyranthes bidentata* que le MeJA agit comme signal volatil émis par une plante, et

métabolisé chez une autre plante par une *METHYL JASMONATE ESTERASE* (MJE) en JA qui est ensuite converti en JA-Ile (Stuhlfelder et al., 2004; Tamogami et al., 2008). C'est donc par ce mécanisme que le MeJA procède à l'activation des réponses JA-dépendantes chez différentes plantes, y compris le Riz. Cependant, aucune MJE n'est à ce jour identifiée chez le Riz. Le Cis-Jasmone (Figure I.4) est une autre forme volatile des JAs pouvant être synthétisée par la décarboxylation du JA (Koch et al., 1997) catalysée par une enzyme encore inconnue actuellement. Contrairement au MeJA, la formation de Cis-Jasmone est irréversible mais ce dernier est capable d'activer des réponses différentes de celles activées par le JA-Ile chez *Arabidopsis* (Matthes et al., 2010).

L'hydroxylation directe du JA a été découverte plus récemment comme un autre mécanisme de déviation du pool de JA pour prévenir la formation systématique de JA-Ile. La réaction est catalysée par des *JA OXIDASE* (JAO/JOX) identifiées chez *Arabidopsis* et ensuite chez le Tabac (*Nicotiana attenuata*) (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b). L'hydroxylation directe du JA est de ce fait la deuxième voie identifiée de production de OH-JA après celle, indirecte, qui permet la déconjugation de l'acide aminé Ile du 12OH-JA-Ile (Widemann et al., 2013). Une étude en cours au laboratoire, s'intéresse particulièrement à la position exacte du groupement hydroxyle introduit par les enzymes JAO d'*Arabidopsis* (**appelé OH-JA dans cet étude**). En effet, dans les extraits de différentes plantes on peut détecter deux isomères positionnels de OH-JA : le 12OH-JA et le 11OH-JA sur lesquels le groupement hydroxyle est respectivement en position C12 et C11 du JA (Miersch et al., 2008). La position du groupement hydroxyle est très discriminante puisque la *SULFOTRANSFERASE* ST2a et les *UDP-DEPENDENT GLYCOSYLTRANSFERASES* (UGT), qui forment respectivement le 12HSO₄-JA et le 12-O-Glc-JA chez *Arabidopsis* (Figure I.4), ont une nette préférence pour l'isomère 12OH-JA (Gidda et al., 2003; Haroth et al., 2019). La dé-conjugaison de l'isoleucine du 12OH-JA-Ile par les *AMIDO HYDROLASES* est une source bien connue de 12OH-JA (Widemann et al., 2013; Marquis et al., 2020). Il serait donc intéressant de savoir la nature exacte du produit formé par les JAO/JOX afin de mieux déterminer si les formes glycosylées et sulfatées du 12OH-JA sont également formées à partir des produits des JAO/JOX. Le cas échéant, ST2a et les UGT contribueraient également à la déviation métabolique du JA. Fernández-Milmanda et al. (2020) soutiennent d'ailleurs, dans une étude récente, qu'une baisse de la qualité de la lumière perçue via l'inactivation du photorécepteur PHYB, régule positivement l'activité de ST2a chez *Arabidopsis*, générant ainsi un puits métabolique déviant le JA de la formation de JA-Ile qui permet d'adapter la croissance de la plante pour l'évitement de l'ombre.

C. Rôles biologiques des JAs chez le Riz

Depuis leur découverte comme composé odorifère (MeJA) de l'huile essentielle de *J. grandiflorum*, les JAs ont été amplement étudiés afin de déterminer leurs fonctions biologiques chez les plantes. Ils seront tout d'abord définis comme des inhibiteurs de croissance (Aldridge et al., 1971; Dathe et al., 1981) puis

comme activateurs de la senescence (Ueda and Kato, 1980) chez différentes espèces de plantes. Leur fonction d'activateurs des réponses de défense contre les insectes herbivores pathogènes microbiens nécrotrophes ne sera définie que plus tard (Farmer and Ryan, 1990; Wasternack and Hause, 2013). On leur attribuera alors le nom d' « hormone de défense » tout comme l'acide salicylique (SA), plus associé à la résistance contre les pathogènes biotrophes (Reymond and Farmer, 1998). Cependant, des études plus récentes démontrent que les défenses induites par les JAs permettaient une résistance à un spectre de pathogènes et ravageurs bien plus large, incluant des virus, des bactéries, des nématodes, ainsi que des champignons hémibiotrophes. De plus, la présence des JAs apparaît comme déterminante dans l'adaptation à différents stress abiotiques auxquels les plantes font face. Ces différentes fonctions des JAs ont particulièrement été mises en évidence chez le Riz, notamment grâce à l'exploitation de mutants et/ou de surexprimeurs de gènes codant des acteurs de la biosynthèse, de la signalisation ou du catabolisme des JAs (Dhakarey et al., 2016).

1. Rôle dans le développement

a. Les JAs, répresseurs de la croissance chez le Riz.

L'inhibition de croissance généralement observée chez les plantes lorsque la signalisation JAs est induite artificiellement, par l'application externe de JAs, est un phénomène également observé chez le Riz. Elle se manifeste de manière dose-dépendante et aboutit, à fortes concentrations, à une réduction spectaculaire de la taille des feuilles et des racines ainsi que du nombre de racines coronaires (Nguyen, 2018). Cette inhibition de croissance exercée par les JAs semble d'ailleurs déjà s'exercer chez le Riz, en absence même de tout stimulus. En effet, les mutants de Riz *aoc* (*cmp2*, *hebiba*, *aoc*), complètement déficients en JAs, présentent des feuilles nettement plus grandes que celles des plantes sauvages (WT) ce qui, à l'échelle de la plante, génère une biomasse plus importante chez les mutants (Figure I.5.a). Il n'est toutefois pas encore bien défini si cette pénalité de croissance chez les WT est due à un plus petit nombre de cellules, à une réduction de la taille des cellules ou à une combinaison de ces deux phénomènes. Il est probable que le mécanisme en jeu implique une interaction de la signalisation JA avec celle des Gibbérellines (GA), connues pour réguler aussi bien l'élongation cellulaire que la multiplication cellulaire (Achard et al., 2009; Cowling and Harberd, 1999). On sait d'ailleurs que chez *Arabidopsis*, dans le processus de régulation de la croissance de l'hypocotyle par la lumière, les JAZs interviennent comme répresseurs des protéines DELLA, pour inhiber leur action répressive sur les facteurs de transcription PIF3 et PIF4 qui régulent positivement la croissance (Hou et al., 2013). L'absence de JAs chez les mutants *aoc* de Riz pourrait alors favoriser la stabilisation des JAZs et leur action répressive sur les protéines DELLA. L'inhabilité de la protéine mutée JAZ1 du mutant *eg2* à être dégradée via le protéasome conduit à un phénotype de croissance très similaire à celui des mutants *aoc* (Cai et al., 2014). Une autre particularité des mutants *aoc*

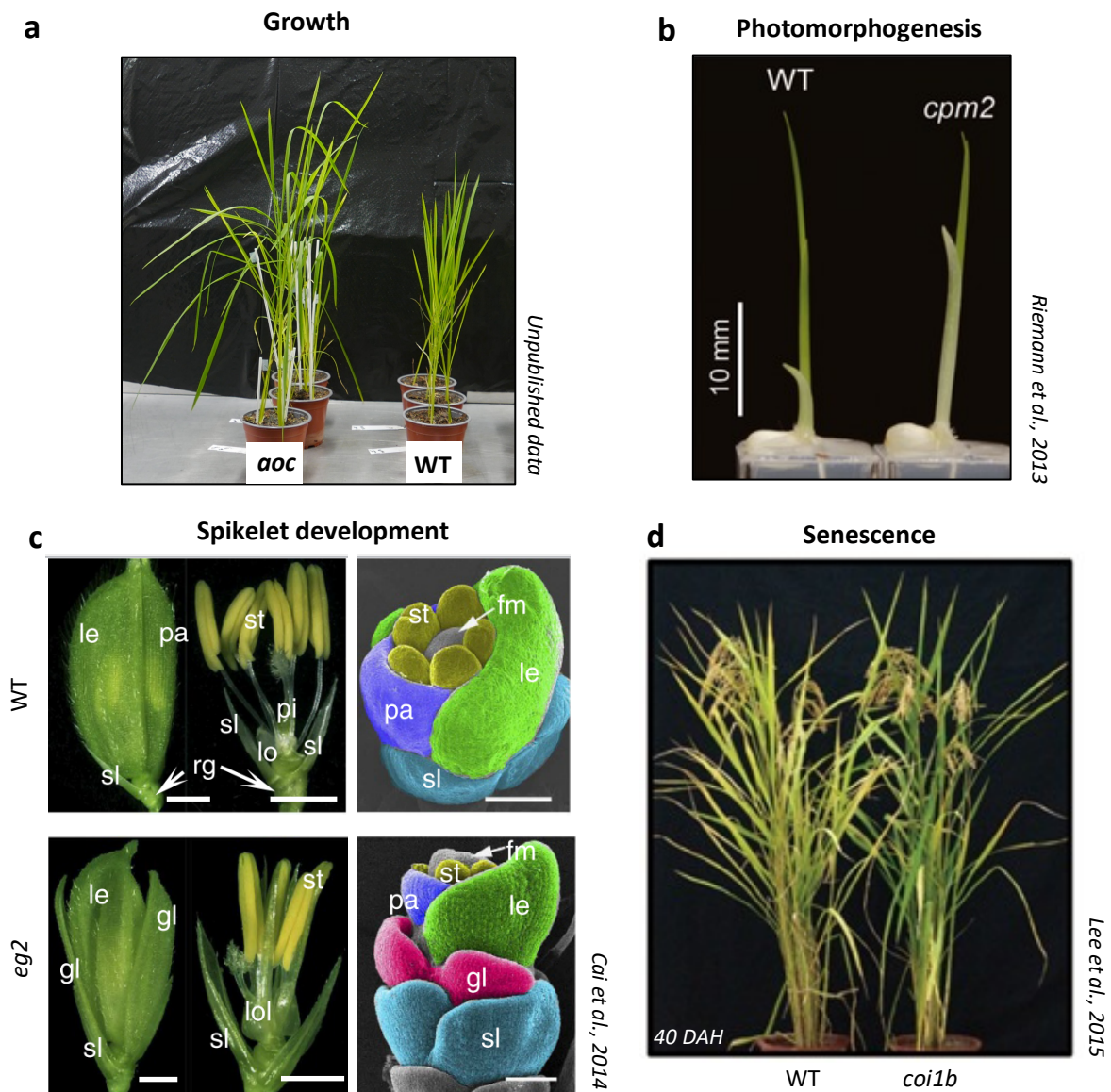


Figure I.5 : Exemples de phénotypes illustrant l'importance des JAs dans la régulation de processus développementaux.

a. mutants *aoc*, déficitaires en JAs, présentant des feuilles nettement plus grandes et une biomasse plus importante que les plantes sauvages (WT) correspondantes. b. Coléoptile très long des mutants déficitaires en JAs *cpm2*, comparé au WT tous les deux cultivés sous lumière rouge continue pendant quelques jours. c. Analyse phénotypique du développement des épillets de plantes WT et de mutants *eg2* (mutant dominant *jaz1*) illustrant le surdéveloppement des glumes chez *eg2*. A gauche, images des épillets de riz. À droites Images au microscope électronique à balayage du primordium de l'organe floral. gl, glume-like; le, lemma; lo, lodicule; lol, lodicule-like; pa, palea; pi, pistil; rg, rudimentary glume; sl, sterile lemma; st, stamen; fm, floral meristem. d. Phénotype "Stay-green" des mutants *oscoi1b-1* pendant la sénescence naturelle 40 jours après l'épiaison (DAH).

est qu'ils présentent, lorsque germés en lumière continue, un coléoptile bien plus long que les semis WT (Riemann et al., 2003, 2013; Nguyen et al., 2019a) (Figure I.5.b). A cause de leur déficience en JA, ces mutants sont donc incapables d'effectuer de la photomorphogenèse et de réprimer la croissance du coléoptile à la perception de la lumière. C'est principalement sur la base de ce phénotype que les individus homozygotes *aoc* sont isolés parmi la descendance des mutants hétérozygotes *aoc/AOC*, puisque les mutants homozygotes *aoc/aoc* sont stériles.

b. Les JAs, essentiels pour le développement « optimal » de l'épillet

La stérilité des mutants *aoc* est en effet une autre conséquence de la déficience en JAs (Riemann et al., 2003, 2013; Nguyen et al., 2019a). Ce phénotype est d'ailleurs une caractéristique typique des mutants déficients en JAs et des mutants insensibles aux traitements JAs ou à la Coronatine (Feys et al., 1994; Park et al., 2002; Li et al., 2004). Chez *Arabidopsis*, il est observé chez les mutants *coil* et *aos*, une stérilité mâle due à une élongation insuffisante des filaments, un pollen non viable et une déhiscence tardive des anthères (Park et al., 2002; Feys et al., 1994). Si les causes secondaires de la stérilité des mutants affectés dans la signalisation JAs sont bien définies chez *Arabidopsis*, elles ne le sont pas pour autant chez le Riz. Il apparaît toutefois que la stérilité observée chez *aoc* est causée par une morphologie anormale de l'épillet, également observée chez d'autres mutants de Riz tels que *egl* et *eg2* (Figure I.5.c), affectés respectivement dans la biosynthèse et la signalisation (Cai et al., 2014). Ces derniers mutants ne sont, certes, pas stériles mais présentent une productivité en graines très réduite. Ceci reflète ainsi le rôle capital joué par les JAs dans la mise en place des organes de reproduction et son importance pour assurer une bonne fertilité et un bon rendement en graines chez le Riz.

c. Les JAs, activateurs de la sénescence

L'implication des JAs dans l'activation de la sénescence est l'une de leurs premières fonctions décrites chez les plantes (Ueda and Kato, 1980). Cette fonction a également été démontrée chez le Riz aussi bien dans un contexte de sénescence induite par un stress environnemental tel que l'obscurité, que dans un contexte de sénescence consécutif à un signal de développement tel que le vieillissement des plantes (Fang et al., 2016; Lee et al., 2015; Uji et al., 2017; Kong et al., 2006; Lim et al., 2020). L'activation de la signalisation JA-Ile médiée par COI1b, un des 3 récepteurs COI présents chez le Riz, semble d'ailleurs déterminante dans l'induction de la sénescence. Le mutant *coilb* présente, en effet, un phénotype *STAYGREEN* (SGR) qui correspond à un retard significatif de l'apparition de la sénescence des feuilles (Lee et al., 2015). Chez *coilb*, on le voit notamment lors de la sénescence induite par l'obscurité et celle induite par le passage au stade floraison (*Heading stage*) où les mutants maintiennent bien plus longtemps l'intégrité de l'appareil photosynthétique que leur homologue WT (Figure I.5.d). Ce phénotype est dû, en partie, à une expression nettement plus faible, chez le mutant *coilb*, de gènes d'activation de la sénescence

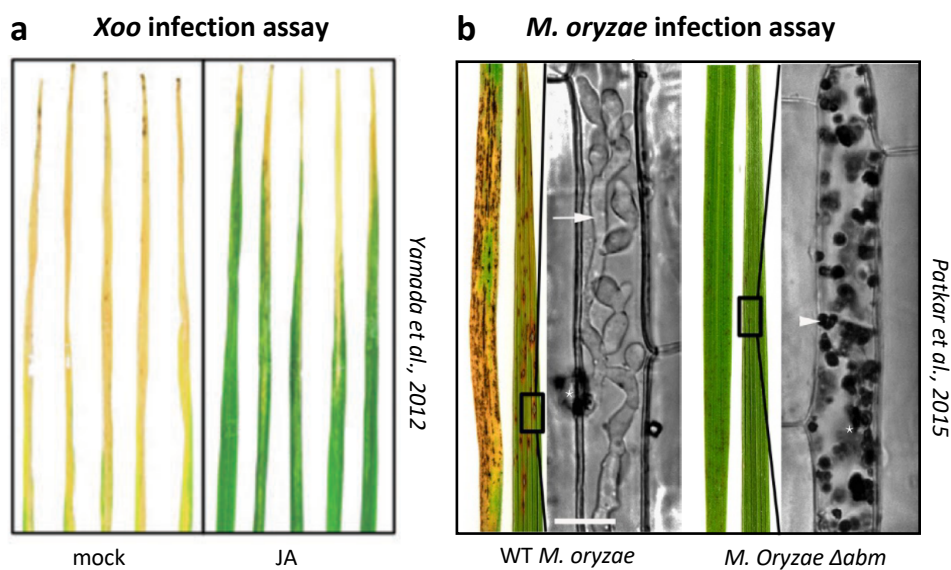


Figure I.6 : **Exemple de stress biotiques impliquant une fonction des JAs.**

a. Symptômes de la maladie *Bacterial blight* chez des plantes de Riz sauvages illustrant que le traitement au JA confère une résistance à l'infection par la bactérie *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (*Xoo*), responsable de la maladie. **b.** Symptômes de la maladie *Blast* chez des plantes de Riz sauvages infectées par une souche de champignon sauvage (WT) *Magnaporthe oryzae* ou par une souche mutée *M. Oryzae* Δabm , chez laquelle le gène codant la monoxygénase Abm (une JA-OXIDASE fongique) est inactivé. la perte d'ABM chez *M. oryzae* conduit à la non-pathogénicité sur le Riz.

(SAG) dont certains, tels que SAG12 et NAP, sont connus pour être des cibles directes du facteur de transcription MYC2 (Lee et al., 2015; Uji et al., 2017). L'activation de la sénescence par les JAs peut être essentielle dans la remobilisation des nutriments des feuilles âgées vers les jeunes feuilles mais elle peut être très désavantageuse lorsqu'elle est activée à l'échelle de la plante car elle réduit la capacité photosynthétique et la fixation de carbone bénéfique pour une bonne qualité de graines.

2. Rôle dans l'adaptation aux stress biotiques

L'appellation d'« hormone de défense » est attribuée aujourd'hui aux JAs parce qu'ils constituent, avec l'acide salicylique, les deux principales phytohormones qui régulent les réponses de défenses des plantes face aux attaques des pathogènes. Ce rôle central des JAs dans la mise en place des défenses des plantes a été mis en évidence grâce notamment à trois observations majeures faites au cours d'études sur les fonctions des JAs et sur les réponses de défenses des plantes face aux pathogènes et ravageurs (Campos et al., 2014). Tout d'abord, il a été constaté que les agressions des plantes par différents pathogènes et ravageurs induisaient fortement et rapidement la biosynthèse des JAs, notamment de JA-Ile. Il a aussi été remarqué que l'activation de la signalisation JAs, par l'accumulation de JA-Ile endogène ou l'application externe de JAs, permettait d'induire significativement l'expression de protéines de défenses PRs (*Pathogenesis-Related*) et la synthèse de nombreuses molécules du métabolisme spécialisé telles que les phytoalexines. Cette importance des JAs a surtout été confortée par l'observation qu'une déficience des plantes dans la biosynthèse ou la perception des JAs coïncide généralement avec une sensibilité accrue à certains pathogènes. De ces études, il est surtout apparu que le mécanisme par lequel les JAs interviennent dans la mise en place des réponses de défenses contre ces pathogènes est globalement similaire et est, pour cela, nommé *JA-Triggered Immunity* (JATI) (Campos et al., 2014). Ainsi, dès la perception de signaux de l'attaque par un de ces agresseurs, la signalisation JAs est induite et celle-ci active par conséquent l'expression de divers facteurs de transcription, qui concourent à la mise en place d'une réponse de défense adaptée à l'agresseur. L'intensification des recherches sur le modèle *Oryza sativa*, depuis le séquençage du génome, ont par ailleurs permis d'élucider l'implication des JAs dans la mise en place des défenses contre des pathogènes et ravageurs majeures du Riz incluant des insectes ravageurs, des champignons, des bactéries ainsi que des virus (Nguyen et al., 2019b).

a. Les JAs favorisent la résistance à la bactérie *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (*Xoo*)

La bactérie *Xoo*, responsable du *Bacterial blight*, est, le pathogène le plus dévastateur pour les cultures de Riz sur la Plaine indo-gangétique (8,5% de perte de rendement entre 2010 et 2014) (Savary et al., 2019). Elle est d'ailleurs d'autant plus virulente lorsque les plantes de Riz présentent une insensibilité aux JAs, comme celles qui surexpriment la protéine ultrastable JAZ8ΔC, insensible à la dégradation via le protéasome du fait de l'absence du degron Jas (Yamada et al., 2012). A l'opposé, un prétraitement de plantes de Riz sauvages aux JAs améliore fortement la résistance à *Xoo* en réduisant les symptômes induits

par l'infection par la bactérie (Figure I.6.a) (Yamada et al., 2012). Les réponses induites par les JAs après infection par la bactérie *Xoo* sont peu connues à ce jour mais la présence de C3H12, un facteur de transcription à doigt de zinc de type CCCH, semble être fortement requis pour l'activation de la biosynthèse et de la signalisation des JAs en réponse à l'infection bactérienne (Deng et al., 2012).

b. Les JAs favorisent la résistance au champignon *Magnaporthe oryzae*

Le rôle des JAs dans la régulation des réponses de défense contre le champignon *Magnaporthe oryzae*, responsable du *Rice blast*, est l'un des mécanismes de défense les mieux définis chez le Riz. L'importance des JAs a été particulièrement mise en évidence chez les mutants de Riz déficient en JAs *cpm2* et *hebiba*, qui présentent une forte sensibilité à la souche incompatible P91–15B de *M. oryzae* comparée aux plantes sauvages. L'incapacité de ces mutants à activer la synthèse de la phytoalexine sakuranétine est sans doute l'une des causes principales de la sensibilité accrue des mutants à ce champignon (Riemann et al., 2013). Il s'avère que l'expression de NOMT, l'enzyme catalysant la conversion de naringénine en sakuranétine, une phytoalexine de la classe des flavonoïdes, est fortement dépendante des JAs qui font défaut chez *cpm2* et *hebiba* (Shimizu et al., 2012; Riemann et al., 2013). Une autre évidence de l'importance des JAs dans l'interaction du Riz avec *M. oryzae* a été apportée par Patkar et al. (2015). Ces auteurs démontrent en effet que la virulence de la souche compatible B157 de *M. oryzae* est due principalement à l'expression de la *JA-monoxygenase* Abm qui oxyde le JA libre pour bloquer probablement la signalisation JAs et faciliter la colonisation des Riz par le champignon (Figure I.6.b).

Outre l'activation des réponses de défenses contre *Xoo* et *Magnaporthe oryzae*, l'implication des JAs dans la résistance à d'autres pathogènes de Riz ainsi qu'à une variété d'insectes a été décrite dans différentes études dont la plupart a été répertoriée par une revue récente (Nguyen et al., 2019b). Leur implication dans la résistance aux infections virales, insoupçonnée pendant longtemps, a récemment été démontrée pour les virus *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV) et *Rice ragged stunt virus* (RRSV) (Zhang et al., 2016a; He et al., 2017). Le génome du virus RRSV code en effet pour un micro-ARN qui, via son action répressive sur le gène *TCP21* (*TEOSINTE BRANCHED/ CYCLOIDEA/PCF 21*), atténue la biosynthèse de JAs et les réponses de défenses induites par la plante infectée (Zhang et al., 2016a).

3. Rôle dans l'adaptation aux stress abiotiques

Comme établi pour les stress biotiques, il est également connu que la perception de certains stress abiotiques par les plantes peut moduler la biosynthèse et la signalisation JAs, suggérant ainsi un rôle potentiel des JAs dans la régulation des réponses induites face à ces changements environnementaux (Du et al., 2013). Ce rôle des JAs dans la réponse aux stress abiotiques n'est toutefois pas aussi bien décrit que leur rôle dans la défenses contre les agressions biotiques. Les données existantes révèlent quelques exemples pour lesquels les JAs occupent une place centrale dans la régulation des mécanismes

d'adaptation (Hu et al., 2017; Dhakarey et al., 2016). C'est surtout le cas de la tolérance des plantes au froid connue pour être positivement régulée par les JAs chez différentes espèces (Hu et al., 2013; Wang et al., 2016; Mao et al., 2019). Chez la tomate, les circuits de régulation, par les JAs, de cette tolérance impliquent une interaction avec la voie de signalisation de l'ABA, l'hormone majeure de réponse aux stress abiotiques (Wang et al., 2016). Les JAs seraient également des régulateurs positifs de la tolérance au stress hydrique (Tang et al., 2020a; Marquis et al., 2022) mais pour ce qui s'agit du stress salin, le rôle exact des JAs est toujours sujet à débat. Des données provenant de différentes espèces démontrent en effet des fonctions positives et négatives des JAs (Qiu et al., 2014; Abouelsaad and Renault, 2018; Chen et al., 2017; Hazman et al., 2015). Les raisons de ces conclusions divergentes restent encore à élucider. Ces différentes fonctions des JAs dans la réponse aux stress abiotiques ont également été largement investies chez le Riz à travers des études qui ont permis d'une part de conforter les observations faites chez d'autres espèces, et d'autre part à identifier de nouveaux mécanismes et acteurs de la tolérance aux stress abiotiques régulés par les JAs.

a. Les JAs favorisent la tolérance du froid

Le Riz, en tant qu'espèce majoritairement subtropicale, est très sensible au froid et requiert la mise en place rapide de mécanismes d'adaptation lorsque les températures baissent dans son environnement de culture. Il s'avère que la signalisation JAs est déterminante pour l'activation de ces mécanismes de tolérance et est induite dès la perception de la baisse des températures (Du et al., 2013; Mao et al., 2019). Le circuit par lequel ce mécanisme est régulé par les JAs a été particulièrement bien décrit chez *Arabidopsis* et fait intervenir le module de facteurs de transcription ICE-CBF/DREB1 pour activer les gènes de tolérance au froid (Hu et al., 2013). OsICE1 et OsICE2 sont deux orthologues des protéines ICE d'*Arabidopsis* qui, lorsqu'elles sont surexprimées chez *Arabidopsis*, améliorent fortement la tolérance des plantes au froid. Cela suggère l'existence d'un mécanisme potentiellement similaire chez le Riz. De plus, ces protéines ICE de Riz sont des interactants directs de MYBS3, un facteur de transcription essentiel pour l'activation des mécanismes de tolérance au froid (Deng et al., 2017; Su et al., 2010). En outre, Mao et al. (2019) ont démontré que la meilleure tolérance au froid du cultivar 02428 (*O. sativa ssp japonica*) par rapport au cultivar *Teqing* (*O. sativa ssp indica*) est essentiellement due à une variation allélique sur le promoteur du gène *HANI*, un gène codant CYP94B4, une enzyme catalysant l'oxydation du JA-Ile en 12OHJA-Ile (Figure I.7.a). Chez le cultivar 02428, *HANI* est par conséquent moins exprimé, permettant une accumulation plus importante de JA-Ile et une meilleure activation de la tolérance au froid.

b. Les JAs favorisent la tolérance au stress hydrique

Le stress hydrique est l'un des stress abiotiques les plus importants dans la culture du Riz, notamment pour les cultures de Riz pluviales. Il correspond à une déprivation d'eau des plantes qui, lorsqu'elle s'étale sur une longue durée, peut aboutir à une sécheresse sévère. Dans les laboratoires de recherche, les

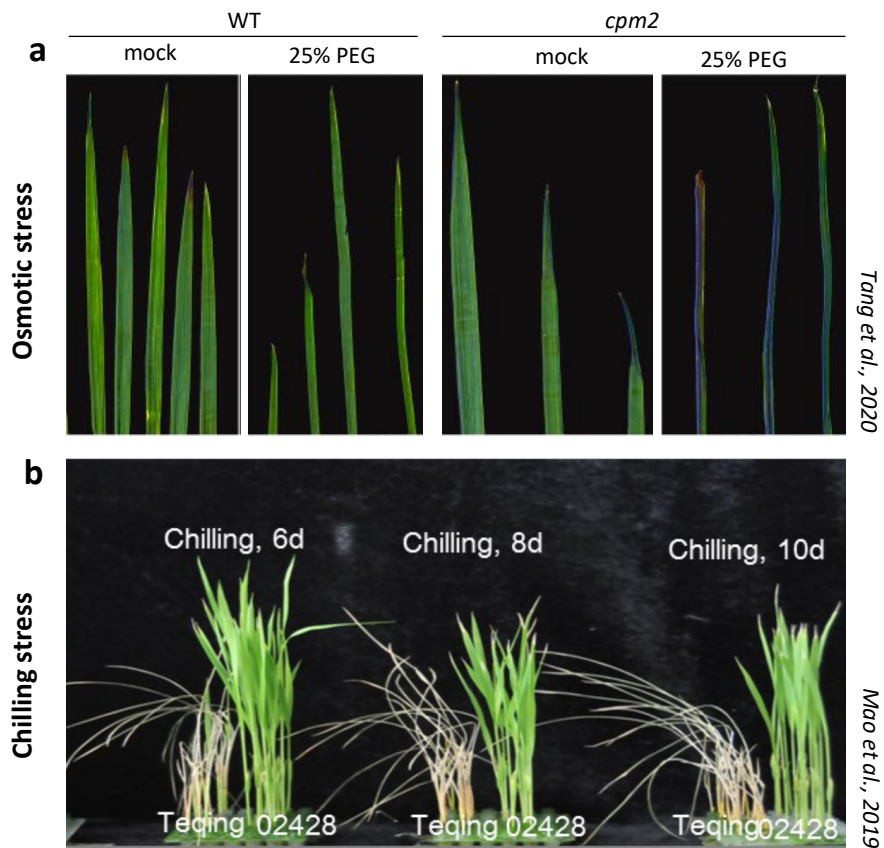


Figure I.7 : Exemples de stress abiotiques impliquant une fonction des JAs.

a. Comparaison de la tolérance au froid entre les cultivars de Riz 02428 (*O. sativa ssp japonica*; tolérant) et Teqing (*O. sativa ssp indica*, sensible). La meilleure tolérance au froid du cultivar 02428 est essentiellement due à une expression plus faible de CYP94B4/HAN1, une enzyme catalysant l'oxydation du JA-Ile en 12OH-JA-Ile. Ceci entraîne une accumulation plus importante de JA-Ile et une meilleure activation de la tolérance au froid chez 02428. **b.** Symptômes du stress osmotique 18 heures après application de 25 % de PEG6000 sur des plantules de Riz 10 jours. Les feuilles des mutants *cpm2*, bien plus larges en conditions normales, sont nettement plus enroulées après l'application du PEG6000. Cela illustre une plus grande sensibilité des plantes de Riz déficientes en JA (*cpm2*) au stress appliqué.

expériences de stress hydrique se font en terre par un arrêt d'arrosage des plantes pour simuler une sécheresse ; et dans le cas d'une culture en hydroponie, par le remplacement de la solution de culture par une solution à faible potentiel hydrique (PEG 6000) afin de créer un stress osmotique direct. Pour chacune des deux approches, il a été montré que l'application du stress induit fortement la signalisation JAs qui régule un certain nombre de réponses (Tang et al., 2020a; Du et al., 2013). La forte sensibilité du mutant déficient en JAs *cmp2* au stress osmotique (Figure I.7.b) et à la sécheresse confirme le rôle central des JAs dans la régulation des mécanismes de tolérance à la déprivation d'eau (Dhakarey et al., 2017; Tang et al., 2020a). Les JAs semblent toutefois agir en synergie avec l'ABA dont l'accumulation après application du stress osmotique suit de très près celle des JAs (Tang et al., 2020a). OsHLH148 est un facteur de transcription dont l'expression est induite aussi bien par le JA que par l'ABA. Il est également identifié comme une cible directe de certains répresseurs JAZ et sa surexpression chez le Riz induit une meilleure tolérance à la sécheresse que les plantes sauvages, certainement due à l'activation des facteurs de transcription DREB1s et leur cibles (Seo et al., 2011).

D. Les objectifs de la thèse

Ces quatre années de mon doctorat ont essentiellement été consacrées à l'étude du fonctionnement des JAs chez le Riz. Pour ce faire, je me suis appuyé sur l'ensemble des données rapportées de différentes espèces de plantes quant au métabolisme, à la signalisation et au rôle des JAs, afin d'explorer des acteurs protéiques dont l'implication dans le fonctionnement des JAs est encore méconnue chez le Riz. Ceci dans le but de mieux comprendre comment, dans des conditions de croissance normales, les JAs sont métabolisés pour assurer un développement optimal du Riz, mais aussi pour déterminer comment les JAs interviennent lorsqu'ils sont mobilisés chez le Riz pour les réponses à différents stress, notamment le stress salin. Ces travaux de recherche ont été menés à travers deux volets.

Le premier volet s'intéresse à l'étude de l'existence chez le Riz d'une activité JA oxydase (JAO), une voie de détournement du flux de JA identifiée récemment chez *A. thaliana* et le *N. attenuata* (Caarls et al., 2017; Smirnova et al., 2017; Tang et al., 2020b). Par le catabolisme du JA, cette voie JAO prévient la formation de l'hormone active JA-Ile faisant de cette voie un levier de contrôle important pour différents processus biologiques régulés par les JAs, notamment la croissance et la résistance à des pathogènes. Ainsi, ce projet vise à savoir si cette voie JAO est également conservée chez le Riz et à déterminer son impact physiologique dans le développement du Riz et l'interaction avec son environnement.

Le deuxième volet s'intéresse spécifiquement aux réponses JAs-dépendantes au stress salin, un problème majeur dans la culture du Riz. Il fait suite à des travaux de nos collaborateurs allemands du Karlsruhe Institute of Technology (Michael Riemann, KIT) qui ont démontré que les mutants de Riz *hebiba* et *cpm2*, tous deux déficients en JAs, présentent des symptômes moins sévères que le sauvage après stress salin (Hazman et al., 2015). La signalisation JA aurait donc un effet délétère dans la réponse du Riz au stress

salin, un phénomène également rapporté par ailleurs dans la littérature (Kurotani et al., 2015b; Ye et al., 2009). L'objectif est donc de comprendre le mécanisme par lequel les JAs influencent la réponse au stress salin en identifiant les marqueurs moléculaires responsables de cette tolérance au sel. Ces cibles des JAs ont été explorées grâce à une étude comparative et non dirigée des transcriptomes et des métabolomes des plantes sauvages et déficientes en JAs.

Chapitre II:

EXPLORATION DE L'ACTIVITE JA OXYDASE (JAO) CHEZ LE RIZ

A. Introduction

1. L'oxydation du JA, un moyen de contrôle du flux hormonal chez Arabidopsis et le Tabac

L'existence d'une voie d'hydroxylation directe de l'acide Jasmonique (JA) chez les plantes est proposée depuis plusieurs années, notamment dans une étude en 2008 dans laquelle les auteurs observaient une accumulation de dérivés sulfatés ou glycosylés dans la séquence de transformation $JA \rightarrow 12\text{-OH-JA} \rightarrow 12\text{-HSO}_4\text{-JA}$ ou 12-O-Glc-JA après blessure des feuilles de tomate (Miersch et al., 2008; Aubert et al., 2015). Ils en déduisaient l'existence par exemple chez la tomate d'une voie d'hydroxylation du JA en 12OH-JA qui, par la suite, donnerait naissance à des dérivés sulfaté ou glycosylé. Malgré la présence de Jasmonates hydroxylés dans toutes les espèces examinées, l'enzyme catalysant cette réaction d'hydroxylation n'avait toutefois pas été décrite. La première enzyme identifiée catalysant l'hydroxylation directe du JA en OH-JA est la monooxygénase ABM du champignon *Magnaporthe Oryzae*, un pathogène de Riz (Patkar et al., 2015). L'hydroxylation du JA par ABM est décrite comme une stratégie mise en place chez le pathogène, permettant de bloquer la signalisation JAs induite suite à l'infection pour ainsi atténuer les réponses de défenses de la plante hôte, par un mécanisme inconnu (Patkar et al., 2015). Deux ans plus tard, les premières enzymes de plantes capables de catalyser l'oxydation directe de JA en OH-JA sont décrites chez Arabidopsis, simultanément par deux études publiées par mon équipe d'accueil et un laboratoire hollandais (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017). Dans ces études, sont caractérisés quatre gènes codant les enzymes AtJAO1, AtJAO2, AtJAO3 et AtJAO4, toutes capables de catalyser l'hydroxylation du JA en OH-JA. Ces découvertes permettent, sans équivoque, de confirmer l'existence chez les plantes d'une voie de catabolisme du précurseur JA comme postulée au préalable par Miersch et al. (2008). Par ailleurs, cette voie JAO a récemment été décrite chez le Tabac, qui comme Arabidopsis possède 4 acteurs enzymatiques (Tang et al., 2020b). Cette dernière découverte suggère donc la conservation de la voie JAO chez différentes espèces de plantes.

2. Les acteurs enzymatiques de la voie JAO

Les enzymes de la voie catabolique JAOs appartiennent à la famille des 2-ODDs/2-OGDs (« 2-Oxoglutarate/Fe(II)-Dependent Dioxygenases ») qui constitue, après les cytochromes P450 (CYPs), la deuxième plus grande famille d'enzymes au sein du règne végétal (245 et 334 CYPs, et 130 et 114 ODDs respectivement chez Arabidopsis et chez le Riz) (Kawai et al., 2014). Les 2-ODDs sont également répandues chez les bactéries, les champignons et les mammifères, certainement du fait que certaines 2-ODDs sont impliquées dans des fonctions basiques telles que la réparation de l'ADN (Aravind and Koonin, 2001). Cependant, chez les plantes, notamment les angiospermes, elles présentent une grande diversité d'enzymes impliquées dans une large variété de réactions du métabolisme spécialisé (Kawai et al., 2014). Les 2-ODDs sont en effet des enzymes solubles qui utilisent, comme cofacteur, un ion ferreux

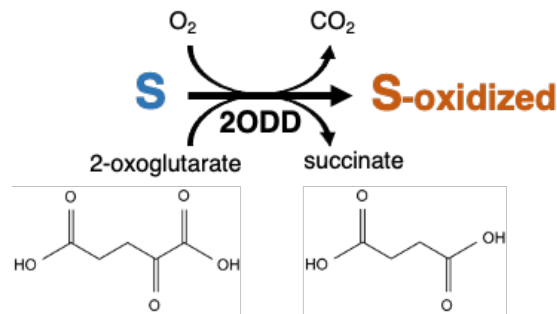


Figure II.2 : Réaction générique d'oxydation par les 2-ODDs de leur substrat (S).

Elles utilisent, comme cofacteur, un ion ferreux Fe²⁺ (non représenté) et comme co-substrats une molécule d'oxygène et une molécule d'oxoglutarate (2-OG) afin de catalyser l'oxydation de leur substrat. La réaction catalysée permet la décarboxylation concomitante du 2-OG pour former du succinate et du dioxyde de carbone.

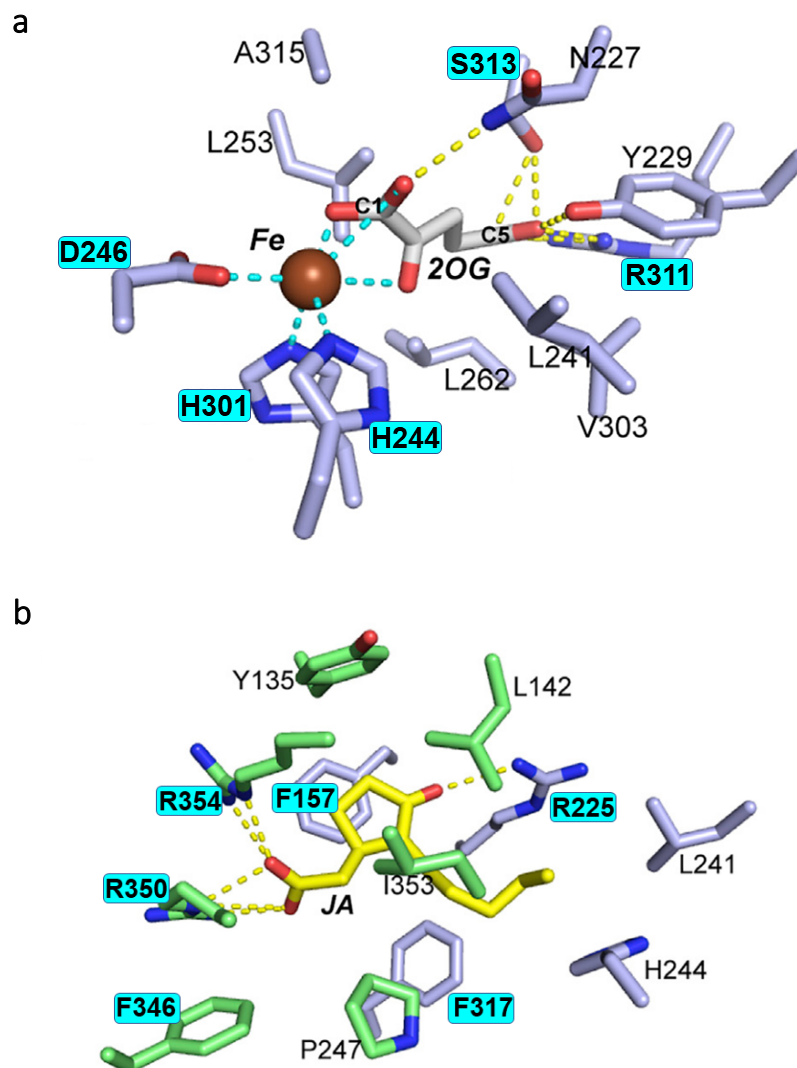


Figure II.1 : Représentation des acides aminés de liaison au co-substrat 2-OG, au cofacteur Fe²⁺ (a) et au substrat JA (b) sur la structure tridimensionnelle de la protéine AtJAO2 d'Arabidopsis.

L'atome de fer est représenté par une sphère brune. Le 2-OG, le JA et les acides aminés sont représentés sous forme de bâtons et colorés par type d'atome : rouge pour l'oxygène et bleu pour l'azote. Les atomes de carbone sont colorés en bleu clair pour les acides aminés situés sur les feuillets β et en vert pour les acides aminés situés sur les hélices α . Les lignes pointillées jaunes et cyan indiquent, respectivement, les liaisons hydrogène et les coordinations avec le fer. Les résidus critiques pour la fonction « JA Oxidase » sont surlignés en bleu cyan. Figure adaptée de Zhang et al., 2021.

Fe^{2+} et, comme co-substrats, une molécule d'oxygène et une molécule d'oxoglutarate (2-OG) pour catalyser l'oxydation de leurs substrats respectifs, avec la décarboxylation concomitante du 2OG pour former du succinate et du dioxyde de carbone (Figure II.1) (Kawai et al., 2014; Hagel and Facchini, 2018). Des analyses cristallographiques de 2-ODDs de fonctions diverses telles que « deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS) » (Valegård et al., 1998) et « clavaminic acid synthase » (Zhang et al., 2000) ont permis d'étudier et de décrire les structures et propriétés biochimiques conservées au sein des 2-ODDs. En effet, ces analyses révèlent la présence, entre les régions N-terminale et C-terminale des 2-ODDs, d'un noyau structural de type DSBH (« Double-stranded β -helix ») relativement bien conservé où on retrouve tous les résidus de liaison au cofacteur Fe^{2+} et au co-substrat 2-OG (Islam et al., 2018; Kawai et al., 2014; Hagel and Facchini, 2018). La liaison de l'ion Fe^{2+} aux 2-ODDs est médiée par trois acides aminés HXD/E...X_n...H communément appelés « facial triad » et la liaison du co-substrat 2-OG est médiée par une arginine et une sérine (RXS), deux acides aminés polaires respectivement à charge positive et neutre (Figure II.2.a). Ces acides aminés sont effectivement fortement conservés au sein des 2-ODDs et donc également chez les JAOs d'*Arabidopsis* et du Tabac (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b).

Une étude phylogénétique des 2-ODDs des plantes modèles représentatives des Chlorophytes (*Chlamydomonas reinhardtii*), des Bryophytes (*Physcomitrium patens*), des Lycophytes (*Selaginella moellendorffii*), des Gymnospermes (*Picea abies*) et des Angiospermes (*A. thaliana*, *O. sativa*) a permis de classer les 2-ODDs en 3 grands groupes phylogénétiques, nommés DOXA, DOXB et DOXC (Kawai et al., 2014). Les 2-ODDs du groupe DOXA ainsi que celles du groupe DOXB sont représentées en des proportions similaires dans les différents organismes étudiés et contiennent principalement des enzymes du métabolisme primaire. Le groupe DOXC est, quant à lui, nettement plus large et diversifié chez les plantes à graines et regroupe principalement des enzymes du métabolisme spécialisé telles que celles impliquées dans le métabolisme des flavonoïdes et des phytohormones (gibbérélines, éthylène, acide salicylique...). C'est d'ailleurs à cette classe DOXC qu'appartiennent les quatre JAOs d'*Arabidopsis* que l'on retrouve plus précisément dans le sous-groupe DOXC46 (Caarls et al., 2017; Smirnova et al., 2017) rassemblant des 2-ODDs de Riz et d'épicéa (Kawai et al., 2014). Cette observation soutient l'existence d'orthologues des AtJAOs, et potentiellement de l'activité « JA Oxidase », chez d'autres espèces végétales. Cependant, ces orthologues semblent n'être présents que chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'après l'analyse de Kawai et al. (2014).

Les JAOs seraient donc des 2-ODDs de type DOXC46 présentes exclusivement chez les plantes à graines et qui utilisent comme substrat le JA. La structure cristallographique de AtJAO2 d'*Arabidopsis* en complexe avec l'ion Fe^{2+} , le 2-OG et le substrat JA publiée récemment (Zhang et al., 2021) a révélé que la structure de la poche catalytique de AtJAO2 permettait d'assurer l'utilisation spécifique du JA comme substrat et non pas ses dérivés MeJA ou JA-Ile. Cette observation est soutenue par l'affinité très forte de

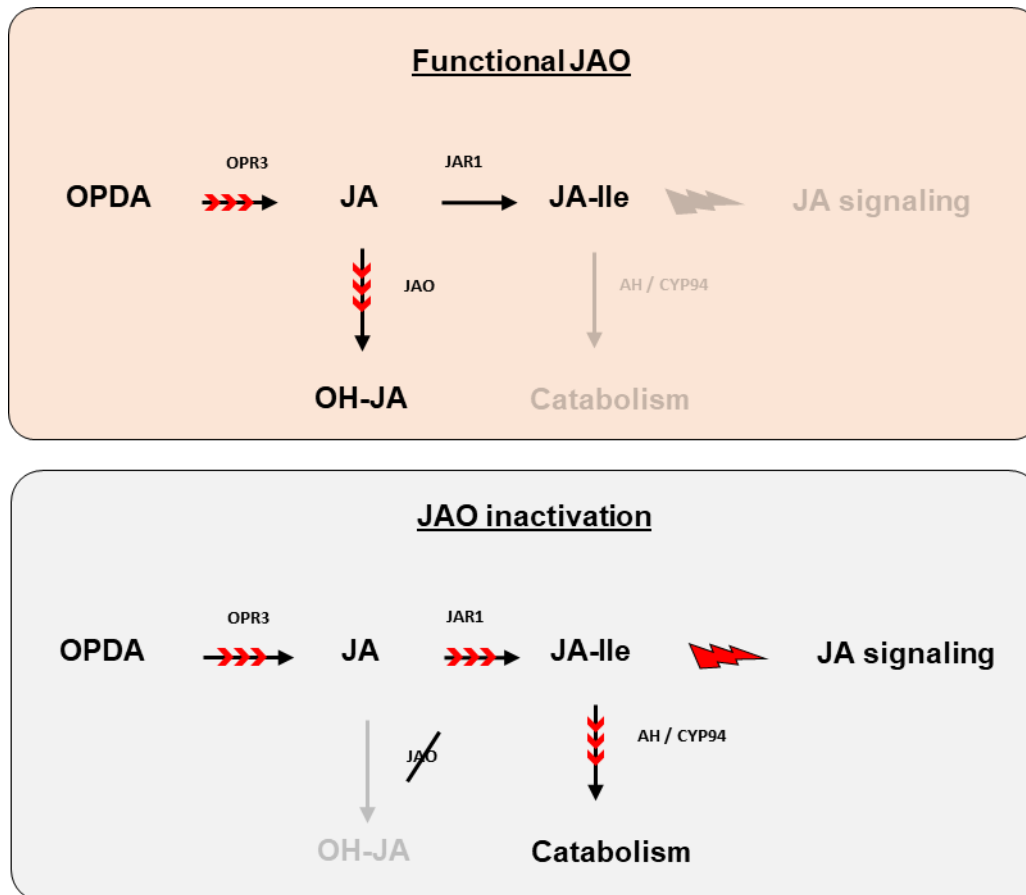


Figure II.3 : **Mécanisme consensuel du fonctionnement de la voie de catabolisme JAO chez Arabidopsis.** L'oxydation directe du JA catalysée par les enzymes JAO constitue un moyen de contrôle du flux de JA et la signalisation par l'hormone JA-Ile dans les feuilles non stimulées. Dans les feuilles WT (panneau supérieur), en l'absence d'un stimulus déclenchant la synthèse de JA, les JAO assurent un catabolisme continu du JA basal par son oxydation en OH-JA et en ses dérivés. Cela minimise la synthèse, la signalisation et le catabolisme de JA-Ile et maintient la répression des réponses JA-Ile. Lorsque la fonction JAO est altérée (panneau inférieur), comme chez les mutants *atjao2* d'Arabidopsis, la consommation réduite de JA canalise davantage de JA vers la synthèse de JA-Ile, ce qui entraîne un catabolisme plus important du JA-Ile mais surtout une signalisation JAs constitutive, pouvant activer les défenses et préparer les feuilles à une résistance à de potentiels agresseurs.

AtJAO2 pour le JA comparée à son affinité quasi nulle pour le MeJA et le JA-Ile. Cette structure cristallographique de AtJAO2 a surtout permis de révéler les principaux résidus de liaison au substrat JA. Il s'agit de trois résidus Arginine (R₂₂₅, R₃₅₀, et R₃₅₄ chez AtJAO2) interagissant avec le substrat JA par des liaisons hydrogène et de trois résidus phénylalanine/tyrosine (F₁₅₇, F₃₁₇ et F₃₄₆ chez AtJAO2) qui, par leur noyau benzénique, stabilisent la position du substrat par des interactions hydrophobes (Figure II.2.b). Cependant, la mutagenèse ciblée de ces résidus a montré que seuls les résidus R₂₂₅ et F₁₅₇ sont vraiment indispensables à la fonction « JA Oxidase » (Zhang et al., 2021) .

Une autre caractéristique des JAOs concerne la régulation transcriptionnelle de leur expression par la signalisation JAs, induite généralement par une application externe de JA ou par différents stress biotiques tels qu'une infection par un pathogène ou une blessure de la plante (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b). Ceci est une propriété commune aux gènes de biosynthèse et de catabolisme des JAs sur lesquels la signalisation JAs exerce un rétrocontrôle positif permettant aux enzymes codées par ces gènes de maintenir le contrôle sur l'homéostasie de l'hormone bioactive (Widemann et al., 2016; Smirnova et al., 2017; Heitz et al., 2012; Wasternack et al., 2006).

3. Rôle physiologique de la voie JAO

Les Jasmonates hydroxylés et leurs dérivés sont relativement répandus et en abondance variable dans les organes de différentes espèces végétales (Miersch et al., 2008). Leur biosynthèse était interprétée comme des formes de stockage, ou d'inactivation, puisqu'avant la découverte du JA-Ile comme ligand spécifique du récepteur COI1 (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007) , le JA était considéré comme un composé actif. Par ailleurs, peu d'activités biologiques étaient associées à ces HO-JA, à l'exception peut-être du rôle d'un isomère de 12OH-Glc-JA dans la fermeture des folioles chez l'arbuste *Albizia* (Nakamura et al., 2011). La découverte par notre équipe d'un rôle régulateur des réponses JA de cette branche métabolique a donc été un résultat inattendu (Smirnova et al., 2017). Leur caractérisation a montré que les JAO/JOX n'éliminent pas un composé actif, mais consomment un pool de JA, le précurseur direct de l'hormone bioactive JA-Ile.

Le puits métabolique que constitue la voie JAO à travers le catabolisme du JA revêt une importance physiologique majeure dans la régulation de la signalisation JA et des réponses physiologiques qu'elle contrôle. Cela a été démontré grâce à l'inactivation totale ou partielle de la voie « JA Oxidase » chez les mutants *jao2* et quadruple *joxQ* d'*A. thaliana* et dans les lignées VIGS-NaJOXs générées par « silencing » chez *N. attenuata* (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b). L'altération de la voie JAO chez ces plantes aboutit à une augmentation significative des teneurs, non pas de JA-Ile, mais de 12COOH-JA-Ile et 12COOH-JA, les 2 catabolites les plus stables des JAs. Cela témoigne d'une augmentation du flux de JA vers l'hormone bioactive JA-Ile qui, de façon très dynamique, est converti en

ces formes inactives. Ce travail a démontré qu'une signalisation peut être augmentée sans forcément élever les niveaux nets de JA-Ile (soumis à un catabolisme rapide), et que paradoxalement, les niveaux des catabolites 12COOH-JA-Ile et 12COOH-JA peuvent être des marqueurs métaboliques de la formation - et de l'action - de JA-Ile. Ce flux augmenté vers l'hormone active causé par le blocage de la voie JAO/JOX résulte en une signalisation JAs constitutive révélée par différents marqueurs géniques dans chacune de ces deux espèces. Chez les mutants *jao2* et *joxQ* d'Arabidopsis, la signalisation constitutive JAs se révèle par une forte élévation de l'expression des marqueurs de défense *AtORA59* et *AtPDF1.2* dans les feuilles non stimulées et une meilleure résistance à l'infection par le champignon *Botrytis cinerea* (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017). Chez le tabac, des augmentations significatives de l'activité TPI (« Trypsin Protease Inhibitor ») et des molécules de défense telles que la nicotine sont également observées dans les feuilles non stimulées des VIGS-NaJOXs. Cela résulte en une meilleure résistance à l'attaque des larves de l'insecte *Spodoptera litura* (Tang et al., 2020b). Ces observations démontrent que la voie catabolique JAO, en détournant le flux de JA, contribue de façon directe au contrôle de l'homéostasie du JA-Ile basal et réprime la signalisation JAs (Figure II.3). De ce fait, la voie JAO exerce également un contrôle sur les réponses physiologiques activées par la signalisation JAs, notamment celles liées à la résistance aux stress biotiques. Elle permet ainsi aux plantes, en absence de tout stress, de prévenir le coût énergétique que peuvent engendrer ces réponses JA-dépendantes afin d'assurer un développement optimal. Cela est particulièrement reflété par la réduction de la taille de la rosette causée par l'inactivation complète de la voie JAO chez le mutant *joxQ* d'Arabidopsis (Caarls et al., 2017).

Smirnova et al. ont réalisé une analyse plus fine du fonctionnement de la voie JAOs d'Arabidopsis, utilisant des mutants knock-out simples, double et triple pour les 4 gènes de la voie JAO (Smirnova et al., 2017). Cette étude a révélé que la réduction de la croissance de la rosette causée par le blocage de la voie JAO n'apparaît que lorsque les trois enzymes majeures AtJAO2, AtJAO3 et AtJAO4 sont simultanément inactivées (Smirnova et al., 2017; Marquis, 2020). Cela indique donc une redondance fonctionnelle, peu surprenante, dans la fonction de ces enzymes à activités biochimiques similaires. Toutefois, l'inactivation de AtJAO4, exprimée dans la zone d'élongation racinaire selon des données publiques sur ePlant (Waese et al., 2017), suffit pour affecter négativement la croissance racinaire, de façon JA-dépendante. Cette réduction de croissance racinaire du mutant *atjao4* est en effet le reflet de cellules de la zone d'élongation racinaire plus courtes chez *atjao4* que chez les plantes WT (Marquis, 2020). Dans les feuilles, bien que n'ayant qu'un impact mineur sur le développement de la rosette, l'inactivation de AtJAO2 – au contraire des autres isoformes – suffit à induire, comme chez le quadruple mutant *joxQ*, une signalisation constitutive JAs, également accompagnée d'une meilleure résistance à *B. cinerea* (Smirnova et al., 2017). AtJAO2 apparaît donc comme l'isoforme prédominante de la voie JAO dans la modulation des réponses JA dans les feuilles d'Arabidopsis. Une caractéristique qu'elle doit certainement à son niveau d'expression basale nettement plus forte que celle des autres isoformes. De plus, Marquis et al. (2022) au laboratoire ont décrit récemment le transcriptome et le métabolome dérégulés chez *jao2*, représentant

environ 400 gènes différentiels et de nombreux métabolites liés à l'adaptation aux stress environnementaux. De ce fait, *jao2* et un mutant triple *jao234* présentent une bien meilleure survie en conditions de stress hydrique sévère, illustrant à nouveau l'impact régulateur intéressant de cette étape métabolique sur les niveaux de tolérance à un large spectre de stress biotiques et abiotiques. Il apparaît ainsi que la différence de niveau et de site d'expression tissulaire des différentes isoformes JAOs soit déterminante pour leur fonction biologique chez *Arabidopsis*. Cela reflète également une versatilité dans le rôle de la voie catabolique JAO lui permettant d'être impliquée, sur des tissus différents, dans divers processus biologiques tels que la régulation de la défense aux pathogènes et la régulation de la croissance racinaire bien connues pour être contrôlées par les JAs. Au cours de ce travail de thèse, de nouvelles données publiées ont montré l'importance de la voie JAO/JOX dans des phénomènes développementaux chez *Arabidopsis*. Par exemple, dans le syndrome d'évitement de l'ombre ("shade avoidance syndrome"), la voie JAO-ST2a conduisant au dérivé sulfaté est recrutée pour atténuer la signalisation JA et permettre une reconfiguration de la croissance et de l'architecture végétative (Fernández-Milmanda et al., 2020). Une autre étude a montré qu'une croissance améliorée à température chaude repose également sur un mécanisme d'élévation du catabolisme de JA (Zhu et al., 2021).

4. Objectifs de l'étude

Sur la base des observations faites du fonctionnement de la voie JAO en particulier chez *Arabidopsis*, il apparaît qu'une connaissance détaillée des acteurs enzymatiques de la voie catabolique des JAO chez les plantes, de leur localisation tissulaire et de leur régulation transcriptionnelle pourrait servir de levier ou de marqueur génétique pour moduler les niveaux de JAs basaux et améliorer la tolérance des plantes à différents stress environnementaux tout en préservant leur croissance et potentiellement leur rendement. C'est principalement pour cette raison que nous nous sommes intéressés à l'étude de la voie JAO chez le Riz, une espèce d'intérêt agronomique, chez qui la voie JAO n'est jusque-là pas décrite. Des avancées notables ont toutefois été faites récemment sur la connaissance du métabolisme et de la signalisation des JAs chez le Riz. Il est bien connu que chez le Riz, les JAs régulent positivement les réponses de défenses à de nombreux pathogènes (la bactérie *Xanthomonas oryzae*, le champignon *Magnaporthe oryzae* et le nématode *Meloidogyne graminicola*...) (Nguyen et al., 2019b) ainsi que l'adaptation à certains stress abiotiques (froid, sécheresse...) (Mao et al., 2018; Tang et al., 2020a; Dhakarey et al., 2017). Par la caractérisation de la voie JAO nous visons principalement à compléter la connaissance déjà établie chez le Riz quant au métabolisme des JAs mais aussi à définir le potentiel de régulation que celle-ci revêt. Le phénomène décrit chez *Arabidopsis* est-il aussi actif chez une céréale ? Une modulation de l'activité JAO permettrait-elle d'apporter des propriétés agronomiques intéressantes ? Pour ce faire, nous avons tout d'abord identifié les acteurs enzymatiques impliqués dans le catabolisme du JA via cette voie JAO et défini leurs profils d'expression chez le Riz. Par la suite, j'ai généré une série de mutants knock-out (ko) simples ou multiples pour les gènes qui codent ces enzymes afin d'inactiver la voie JAO de Riz de façon

Protein name	ID RAPDB	ID MSU	Score (%)
OsJAO1	Os01g0832600	LOC_Os01g61610	70.2
OsJAO2	Os05g0127500	LOC_Os05g03640	69.4
OsJAO3	Os03g0289800	LOC_Os03g18030	64.8
OsJAO4	Os11g0437800	LOC_Os11g25060	60.3

Tableau II.1 : Matrice de similarité des séquences protéiques de AtJAO2 d'Arabidopsis avec les quatre candidats JAOs identifiés dans le génome du Riz.

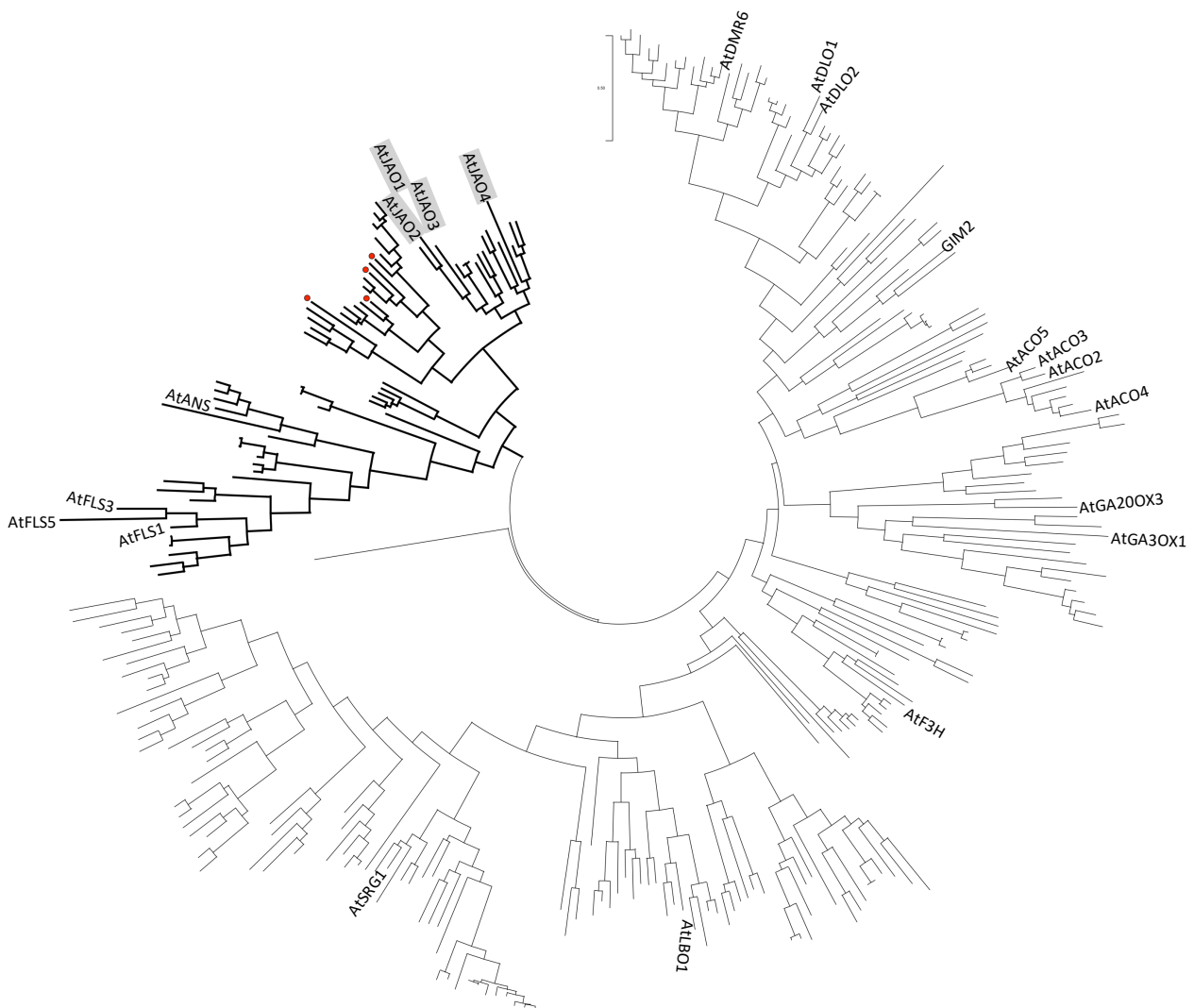


Figure II.4 : Arbre phylogénétique regroupant les JAOs d'Arabidopsis et du Tabac et des 2-ODDs proches retrouvées chez différentes espèces de plantes terrestres.

Les séquences des 2-ODDs utilisées ont été sélectionnées sur la base de leur proximité avec la séquence de AtJAO2 (> 35% d'identité de séquence) chez des organismes modèles représentatifs des dicotylédones (*Populus tremula*, *Nicotiana attenuata*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*) des monocotylédones (*Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*, *Zea mays*), des gymnospermes (*Picea abies*), des lycophytes (*Selaginella moellendorffii*) et des bryophytes (*Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*). Cet arbre a été dressé en utilisant la méthode « Maximum likelihood » après alignement des séquences des protéines par la méthode « Muscle ». Le groupe monophylétique avec les branches épaisses correspond au groupe de protéines proches des JAOs, FLS et ANS d'Arabidopsis (voir Figure II.5). Les points rouges indiquent la position des 4 candidats JAOs identifiés dans le génome du Riz.

partielle ou complète. Ces mutants ont servi à évaluer l'impact de la voie JAO et la contribution des différents enzymes dans le métabolisme des JAs, le développement de la plante, et la signalisation JAs de ses réponses défensives.

B. Résultats

1. Caractérisation des enzymes « JA Oxydases » chez le Riz

Les enzymes JAOs, si elles existent chez le Riz, devraient donc correspondre à des protéines avec une forte similarité de séquences avec les JAOs d'Arabidopsis et du Tabac et qui appartiennent donc à la grande famille des 2-ODDs, notamment au sous-groupe DOXC46. Cela implique également la conservation, dans la séquence de ces protéines, de tous les résidus requis pour la liaison au cofacteur Fe^{2+} , au co-substrat 2-OG et du substrat JA (Zhang et al., 2021), caractéristiques partagées par les JAO actives étudiées chez Arabidopsis et Nicotiana. Une autre propriété importante est que ces 2-ODDs devraient être inductibles par la signalisation JA ou des stimuli activant cette voie hormonale. C'est donc sur la base de ces critères que nous allons rechercher les enzymes JAOs avant d'analyser leur fonctions biologiques plus tard.

a. Identification des candidats JAOs

La séquence de la protéine AtJAO2 d'Arabidopsis a été utilisée pour rechercher ses orthologues et potentielles JAOs chez le Riz par une analyse de type Blast sur la base de données de séquences de la base MSU (Kawahara et al., 2013). Cette analyse a révélé quatre protéines à plus de 60% de similarité de séquences avec AtJAO2 (Tableau II.1). il s'agit de 3 protéines codées par les gènes *LOC_Os01g61610* (*Os01g0832600*), *LOC_Os05g03640* (*Os05g0127500*) et *LOC_Os11g25060* (*Os11g0437800*) annotées comme des « Flavonol synthases » (FLS) et une quatrième protéine annotée comme une « Leucocyanidin oxygenase » (LDOX) et codée par le gène *LOC_Os03g18030* (*Os03g0289800*). Aucun des quatre candidats JAOs identifiés n'avait auparavant fait l'objet d'une étude. L'annotation pour ces 4 protéines n'est donc basée que sur la similarité de leur séquence avec celles de FLS et LDOX caractérisées. Pour vérifier la proximité des candidats JAOs de Riz avec les JAOs déjà caractérisées, un arbre phylogénétique a été dressé incluant, au-delà des JAOs du tabac sauvage et d'Arabidopsis, d'autres séquences de 2-ODDs proches de AtJAO2 (> 35% d'identité) extraites d'organismes modèles représentatifs des dicotylédones (*Populus tremula*, *Nicotiana attenuata*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*) des monocotylédones (*Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*, *Zea mays*), des gymnospermes (*Picea abies*), des lycophytes (*Selaginella moellendorffii*) et des bryophytes (*Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*). Sur cet arbre, on retrouve les potentiels JAOs de Riz dans un grand groupe monophylétique qui incluent les JAOs et les enzymes LDOX (également appelé Anthocyanidines synthase - ANS) et FLS caractérisées chez Arabidopsis (Figure II.4). Les candidats JAOs de Riz semblent toutefois plus proche

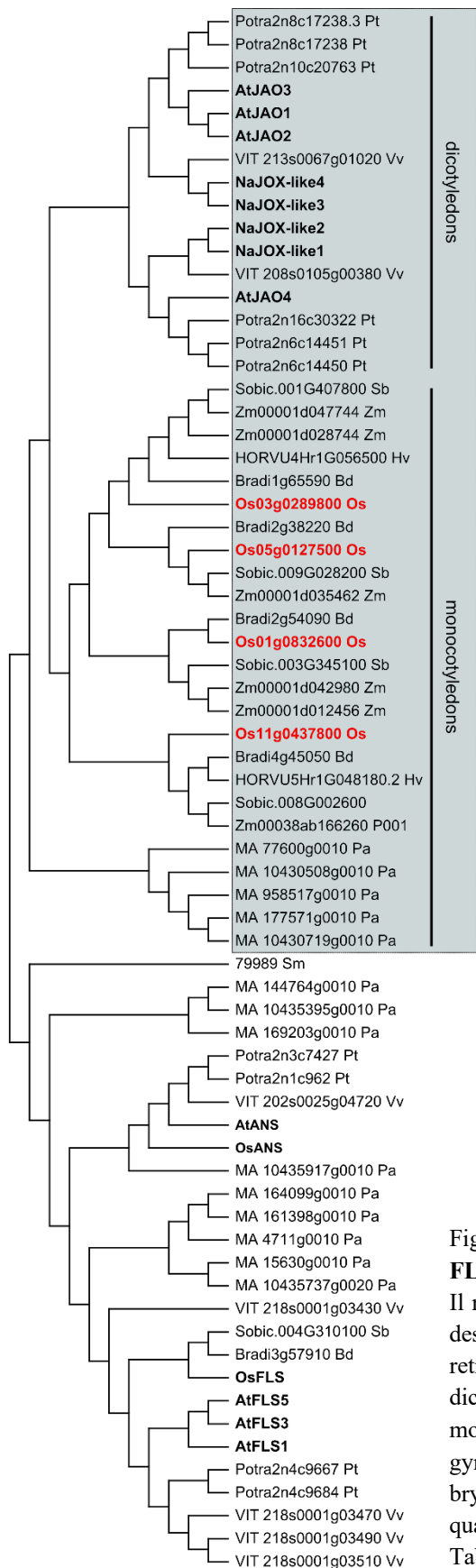


Figure II.5 : Arbre phylogénétique des protéines proches des JAOs, FLS et ANS d'Arabidopsis extraits de l'arbre de la figure II.4.

Il regroupe les JAOs caractérisées chez *A. thaliana* et *N. attenuata* et des 2-ODDs proches d'AtJAO2 (> 35% d'identité de séquence) retrouvées chez des organismes modèles représentatifs des dicotylédons (*P. tremula*, *N. attenuata*, *V. vinifera*, *A. thaliana*) des monocotylédons (*O. sativa*, *S. bicolor*, *B. distachyon*, *Z. mays*), des gymnospermes (*P. abies*), des lycophytes (*S. moellendorffii*) et des bryophytes (*P. patens*, *M. polymorpha*). En rouge, sont représentés les quatre candidats JAOs chez le Riz. En gras, les enzymes de Riz, du Tabac et d'Arabidopsis dont les fonctions sont déjà caractérisées.

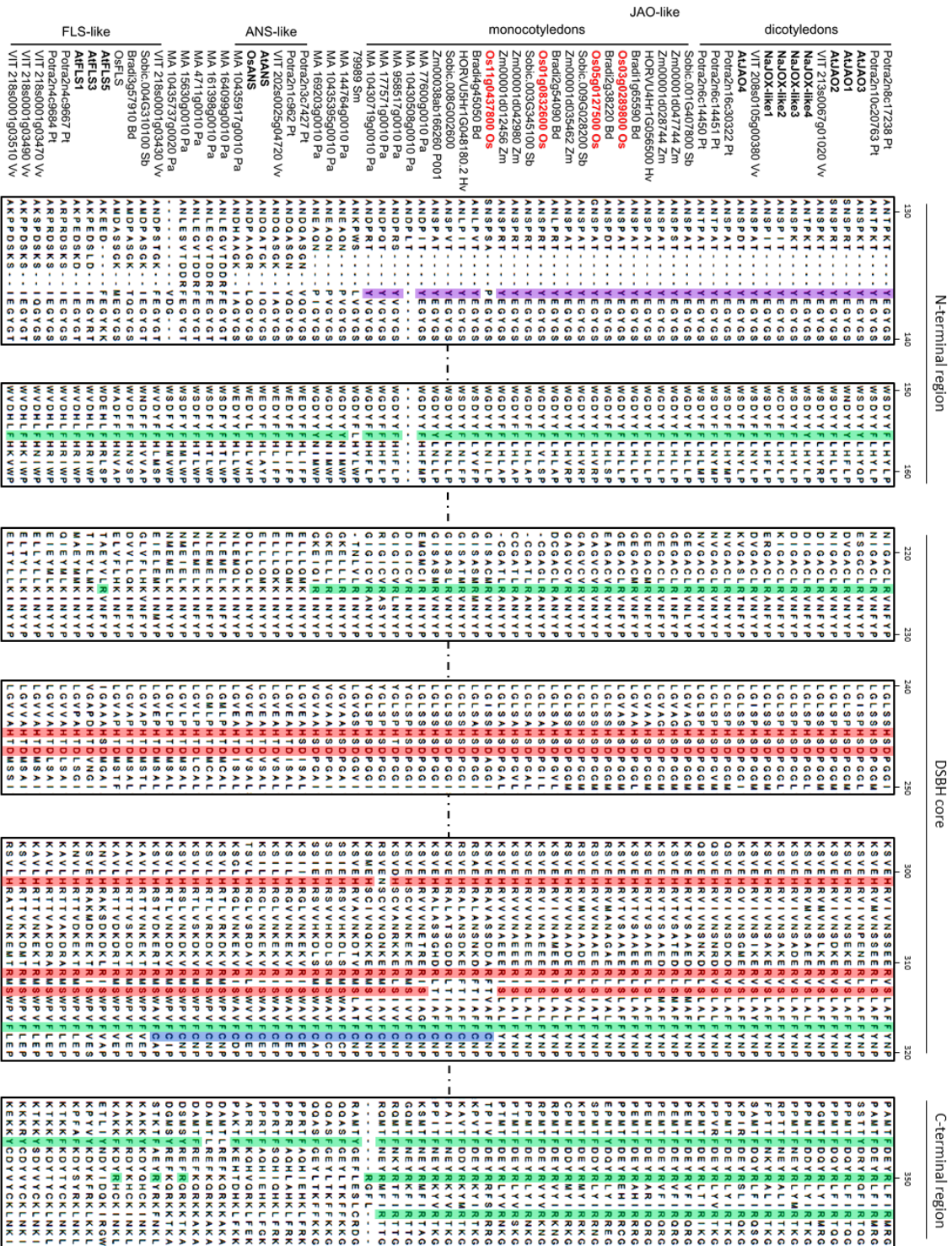


Figure II.6 : **Alignement des séquences des protéines « JA-Oxidase » avec celles des protéines FLS et ANS/LDox et leur potentiels orthologues.**

Il illustre une conservation totale des acides aminés essentiels à la fonction « JA Oxidase » uniquement chez les protéines JA-Oxidase. En vert : les résidus de liaison au substrat JA ; En rouge : les résidus de liaison au co-substrat 2OG et du cofacteur Fe²⁺ ; En violet : Tyrosine (Y¹³⁵ de AtJAO2) contribuant à la liaison hydrophobique entre les JAOs et JA ; En bleu : résidus exclusivement présents chez la potentielle OsJAO4 (codée par *Os1lg0437800*) et ses 4 proches orthologues chez les monocotylédons.

■ 2-Og and Fe²⁺ binding residues
 ■ Essential JA binding residues
 ■ Additional JA binding residu
 ■ Canonical Cysteine of ANS/LDOX

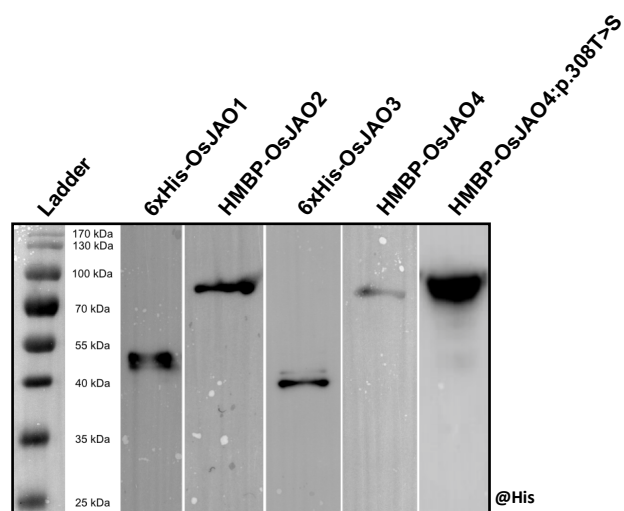


Figure II.7 : **Immunoblot des protéines recombinantes OsJAO* (6xHis ou HMBP) utilisées pour les tests d'activité « JA Oxidase » *in vitro*.**

Ces protéines ont été exprimées de façon hétérologues dans des bactéries *Escherichia coli*. Les lysat des bactéries exprimant les protéines 6xHis-OsJAO1 et HMBP-OsJAO4:p.308T>S ont directement été utilisés pour les tests d'activité alors que les tests des protéines HMBP-OsJAO2, 6xHis-OsJAO3 et HMBP-OsJAO4 ont été réalisés après leur purification par chromatographie d'affinité grâce à l'étiquette 6xHis. . Les protéines sur cet immunoblot sont révélées grâce à un anticorps anti-His, produit chez la souris, lui-même ciblé par un anticorps « Goat anti-mouse » couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase). La HRP émet une luminescence en présence du substrat luminol qui est détectée avec le système de camera Fusion FX.

des JAOs d'Arabidopsis que des LDOX et FLS. Au sein de ce grand groupe de protéines, ces candidats JAOs forment en effet un groupe monophylétique plus restreint contenant les JAO d'Arabidopsis et de Tabac et d'autres protéines des plantes dicotylédones (*P. tremula*, *N. attenuata* et *V. vinifera*) et monocotylédones (*S. bicolor*, *B. distachyon*, *Z. mays*) ainsi que des protéines de la gymnosperme *P. abies* (Figure II.5). Les protéines de ce petit groupe monophylétique des JAOs sont désignées protéines « JAO-like » pour la suite du projet, du fait de leur proximité avec les JAOs caractérisées.

Par la suite, j'ai établi un alignement multiple de séquences des protéines « JAO-like » pour vérifier si les résidus de liaison au cofacteur Fe^{2+} , au co-substrat 2-OG et au substrat JA, essentiels à la fonction « JA Oxidase », sont conservés chez ces protéines. Cette analyse est d'ailleurs élargie à toutes les protéines présentes dans le groupe monophylétique des protéines JAO, ANS et FLS (Figure II.6). Au niveau du motif DSBH, on retrouve le « facial triad » **HXD/E...X_n...H** parfaitement conservé dans la totalité des séquences protéiques analysées (exceptée la protéine d'épicéa MA_177571g0010). Les résidus de liaison au 2-OG (RXS) sont également bien conservés sauf chez 5 protéines « JAO-like » de céréales, dont le candidat JAOs de Riz Os11g0437800, chez lesquelles on observe une mutation de la Sérine (S) en Thréonine (T). Bien que les résidus S et T soient tous deux des acides aminés polaires à charge neutre, aux propriétés biochimiques très proches, aucune des 2-ODDs actives caractérisées n'est jusque-là décrite avec une telle substitution. L'apparition de cette mutation S > T est donc un événement rare au sein des 2-ODDs qui n'est toutefois pas décrite comme une propriété limitante pour l'activité oxydase des 2-ODDs. Les résidus de liaison au JA, au nombre de 6 (**R...X_n...R...X_n...R** et **Y/F...X_n...F...X_n...F/Y**) ne sont, quant à eux, conservés dans leur totalité que sur les séquences des protéines « JAO-like » (exceptée la protéine d'épicéa MA_10430508g0010). Ces dernières possèdent donc, sur leur séquence, tous les acides aminés essentiels à l'activité « JA Oxidase » et seraient potentiellement capable de catalyser l'hydroxylation du JA en OH-JA.

Cette analyse phylogénétique suggère l'existence de 4 orthologues des enzymes JAOs chez le Riz, nommés, sur la base de leur similarité de séquence avec les JAOs d'Arabidopsis (Tableau II.1) : OsJAO1 (Os01g0832600), OsJAO2 (Os05g0127500), OsJAO3 (Os03g0289800) et OsJAO4 (Os11g437800). Elle révèle également que des séquences orthologues des JAOs sont présentes chez différentes espèces de plantes monocotylédones et dicotylédones mais pas chez les lycophytes et les bryophytes.

b. Validation expérimentale de l'activité JA Oxydase (JAO) des candidats OsJAO

La validation de l'existence d'une voie JAO fonctionnelle chez le Riz requiert de démontrer qu'au moins un des 4 candidats JAOs identifiés est capable de catalyser l'hydroxylation du JA en OH-JA. Cette question a été adressée dans cette étude par deux approches différentes. La première approche est un test d'activité *in vitro* qui consiste à incuber chacune des quatre protéines identifiées en présence du substrat JA, du co-substrat 2-OG et du cofacteur Fe^{2+} et de rechercher en LC-MS/MS la formation de OH-JA. La

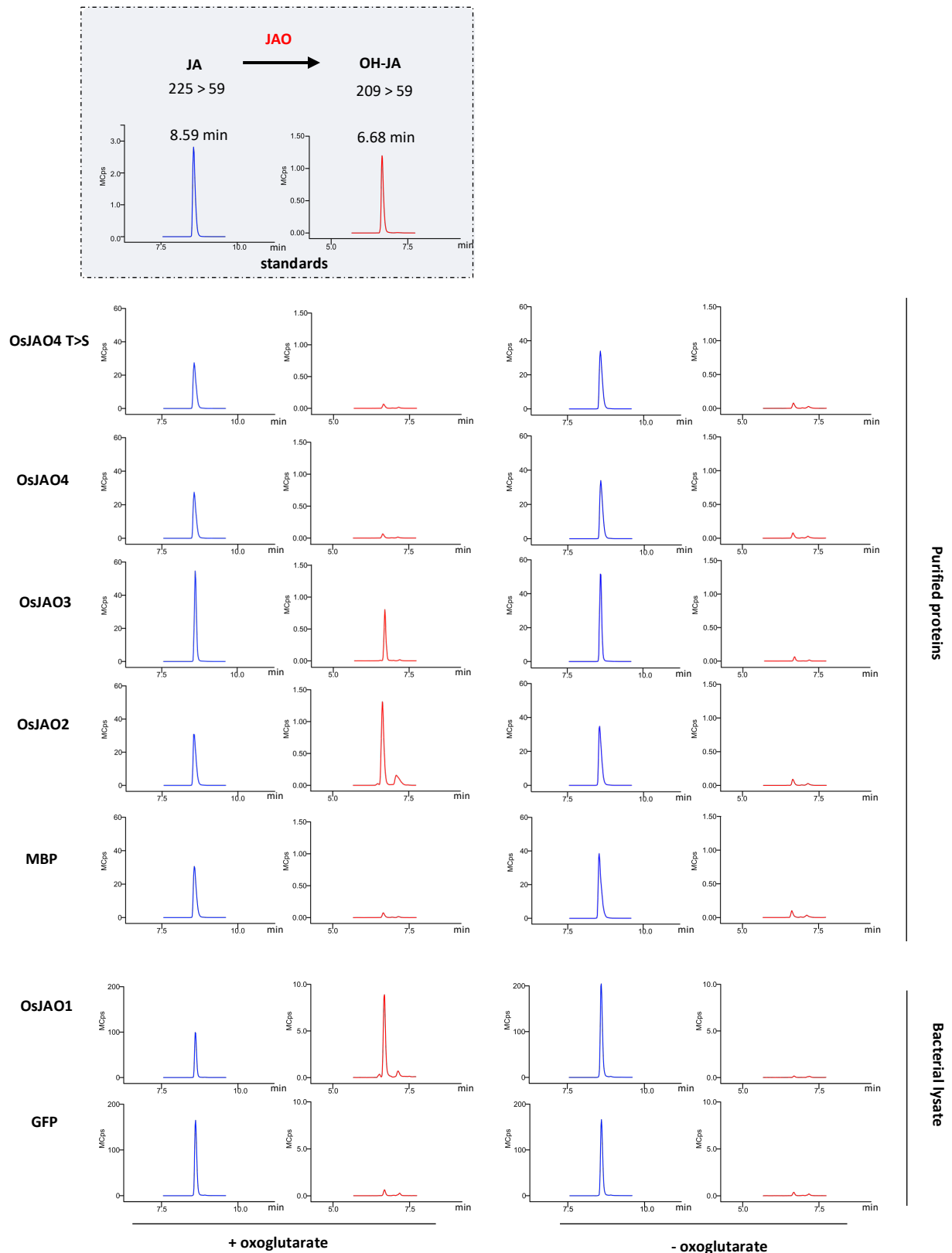


Figure II.8 : Test de l'activité « JA-Oxidase » des 4 candidats OsJAOs réalisés *in vitro*.

Chromatogrammes du substrat JA et du produit OH-JA des enzymes JAO détectés après analyse en LC-MS/MS. Chaque test enzymatique réalisé avec les différents candidats OsJAO, en présence ou absence du co-substrat 2OG, a été analysé pour confirmer la présence du substrat JA et rechercher l'apparition du produit OH-JA. L'identification des deux métabolites se fait sur la base de leur temps de rétention (8,59 mn pour le JA et 6,68 mn pour le OH-JA) et leur transition de masse en MRM (mode négatif, m/z 225 > 59 pour 12OH-JA et m/z 209 > 59 pour JA) définis grâce aux standards purs. MCps : Megacoups. OsJAO4T>S = OsJAO4:p.308T>S.

seconde est une approche par complémentation fonctionnelle du mutant *atjao2-2*, qui, à cause de l'inactivation de *AtJAO2*, codant la JAO prédominante dans les feuilles Arabidopsis, présente une signalisation JAs constitutive révélée par la surexpression des marqueurs de défense JA-dépendants *AtPDF1.2* et *AtORA59* (Smirnova et al., 2017). La réintroduction d'une activité *JAO* fonctionnelle chez ce mutant *atjao2-2* permettrait de reverser la signalisation constitutive JAs et de réduire l'expression de ces marqueurs à des niveaux similaires à ceux des plantes sauvages (WT).

i. Test enzymatique *in vitro*

Le protocole du test d'activité « JA Oxidase » *in vitro* a été développé dans mon équipe d'accueil depuis quelques années et a notamment servi à caractériser les quatre JAOs d'Arabidopsis. Il nécessite au préalable l'expression, dans des bactéries *Escherichia coli*, des différents candidats JAOs avec une étiquette 6xHis ou 6xHis-MBP qui permet d'une part, de confirmer l'expression des protéines d'intérêt et d'autre part leur purification par affinité. La capacité de chaque candidat JAO à hydroxyler le JA est testée en utilisant la protéine purifiée ou, dans le cas des protéines peu solubles dans les systèmes bactériens, le lysat des bactéries exprimant la protéine d'intérêt. Chaque test enzymatique est réalisé en incubant la protéine d'intérêt d'une part avec un milieu réactionnel complet contenant le cofacteur Fe^{2+} , le substrat JA et le co-substrat 2-OG et d'autre part avec un milieu réactionnel sans 2-OG pour vérifier le caractère oxoglutarate-dépendant du produit formé. Après incubation, chaque milieu réactionnel est analysé en LC-MS/MS pour rechercher l'apparition du produit OH-JA.

L'expression et la purification des protéines OsJAO2 et OsJAO4, chacune avec une étiquette 6xHis-MBP, et de la protéine OsJAO3, avec une étiquette 6xHis, a été réalisée avec succès (Figure II.7). Leur capacité à hydroxyler le JA a été testée avec les préparations purifiées des 3 protéines en utilisant comme contrôle négatif une protéine MBP purifiée. Comme attendu, le produit OH-JA n'a été détecté dans aucun des tests enzymatiques (avec 2-OG et sans 2-OG) réalisés avec la protéine MBP (Figure II.8). Dans les milieux réactionnels incubés avec les candidats OsJAO2 et OsJAO3, on détecte de façon nette le produit OH-JA en présence de 2-OG alors qu'en absence de 2-OG il n'est pas détecté. Cela démontre que les protéines OsJAO2 et OsJAO3 sont effectivement des JA Oxidases. Quant aux tests réalisés avec la protéine OsJAO4, le produit OH-JA n'est détecté dans aucun des milieux réactionnels suggérant que la protéine OsJAO4 est incapable d'hydroxyler le JA dans nos conditions expérimentales. Suite à cette observation, nous avons émis l'hypothèse que l'inactivité de la protéine OsJAO4 pourrait être due à la présence d'une thréonine (T₃₀₈) à la place de la sérine canonique des 2-ODDs (figure II.6). Afin de tester cette hypothèse, j'ai obtenu une séquence ADN synthétique codant une protéine OsJAO4 (nommée OsJAO4:p.308T>S) chez laquelle la thréonine est remplacée par une Sérine. Cette OsJAO4:p.308T>S, exprimée avec une étiquette 6xHis-MBP puis purifiée, a été testée, au même titre que les autres OsJAOs, pour sa capacité à hydroxyler le JA. Cependant, comme la protéine OsJAO4 native, le produit enzymatique OH-JA des JAO

Complementation of AtJAO2 function by :

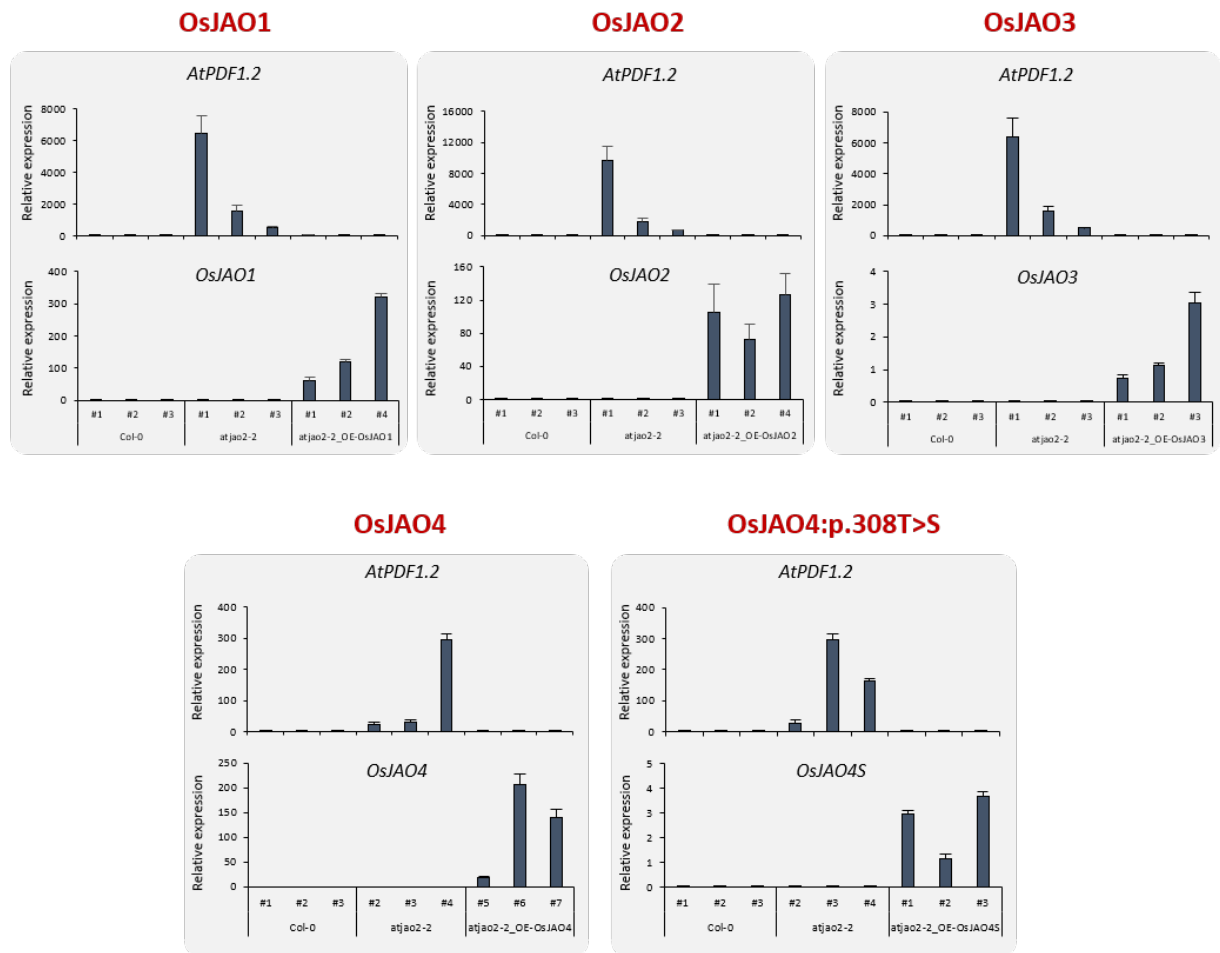


Figure II.9 : Résultats des expériences de complémentation, chez le mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis, de la fonction de AtJAO2 par les JAOs de Riz.

Les CDS des 4 OsJAOs natives et la séquence codant la protéine mutée OsJAO4:p.308T>S ont chacun été exprimées, de façon stable, avec un promoteur 35S chez le mutant *atjao2-2*. Les ARN de ces mutants *atjao2-2* transformés avec les transgènes OsJAO, de plantes Col-0 et de mutants *atjao2-2* ont été analysés en RT-qPCR pour visualiser l'expression des transgènes *OsJAOs* et évaluer, chez les différents génotypes, l'expression de *AtPDF1.2* utilisé comme marqueur de la signalisation JAs. Le niveau d'expression des gènes cibles est déterminé par rapport au celui des gènes de référence *EXP* et *TIP41*. *OsJAO4S* : CDS codant pour OsJAO4:p.308T>S.

n'est détecté dans aucun des milieux réactionnels après incubation avec OsJAO4 :p.308T>S (Figure II.8). Cela suggère alors que l'absence d'activité JAO de la protéine OsJAO4 native ne serait pas due à la substitution de cette Sérine canonique des 2-ODDs.

La protéine OsJAO1 exprimée avec une étiquette 6xHis, s'est montrée moins abondante dans la fraction soluble du lysat bactérien. De plus, son affinité pour la colonne « His-Trap FF crude » s'est avérée faible, rendant ainsi sa purification peu efficace (Figure II.7). De ce fait, le test de l'activité oxydase de cette protéine OsJAO1 a été réalisé directement avec le lysat bactérien. Comme contrôle négatif à ce test, le lysat de bactéries exprimant la protéine eGFP a été utilisé ; son incubation avec les milieux réactionnels complet (+2-OG) ou sans 2-OG ne donne aucun signal correspondant au produit OH-JA (Figure II.8). L'incubation du lysat bactérien exprimant la protéine OsJAO1 avec le milieu réactionnel produit un signal OH-JA uniquement en présence de 2-OG. Cela démontre que la protéine OsJAO1 est effectivement une JAO, comme ses paralogues OsJAO2 et OsJAO3. La formation de OH-JA par ces 3 enzymes de Riz est donc une réaction 2-OG dépendante.

ii. Complémentation fonctionnelle du mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis

On sait que l'expression de AtJAO2, sous promoteur p35S, chez le mutant d'Arabidopsis *atjao2-2* permet de compléter la déficience de la protéine AtJAO2 qui résulte en une signalisation JA constitutive. Cette complémentation fonctionnelle se traduit particulièrement par la répression de l'expression des marqueurs de défense JAs-dépendants, *AtORA59* et *AtPDF1.2*, notablement surexprimés chez le mutant *atjao2-2*, à une expression de niveau sauvage, voire inférieure à celle de Col-0 (Smirnova et al., 2017). Si l'on admet que toutes les JAOs exercent la même la fonction biochimique d'hydroxylation du JA en OH-JA, les JAOs de Riz devraient aussi compléter le phénotype moléculaire de *atjao2-2*. Sur cette base, j'ai préparé différentes constructions plasmidiques permettant d'exprimer chez *atjao2-2* chacun des 4 candidats OsJAOs et la protéine mutée OsJAO4:p.308T>S, fusionnés à une étiquette eGFP (N-terminal), sous le contrôle du promoteur p35S. Des plantes *atjao2-2* ont été transformées avec chacune des constructions générées et les transformants, au sein de leur descendance, sélectionnés sur la base de leur résistance à l'antibiotique kanamycine dont le gène de résistance est également codé par l'ADN-T intégré dans le vecteur pEAQ utilisé.

L'expression des transgènes *OsJAO1*, *OsJAO2*, *OsJAO3* et *OsJAO4* et celui codant la protéine OsJAO4 :p.308T>S (*OsJAO4S*) a été analysée par RT-qPCR respectivement sur les ARN de plantes *atjao2-2_OE-OsJAO1*, *atjao2-2_OE-OsJAO2*, *atjao2-2_OE-OsJAO3*, *atjao2-2_OE-OsJAO4* et *atjao2-2_OE-OsJAO4S* ainsi que sur les plantes sauvages Col-0, et le mutant parental *atjao2-2*. L'expression de chacun des gènes de Riz, indétectable chez les plantes non transformées Col-0 et *atjao2-2*, est validée

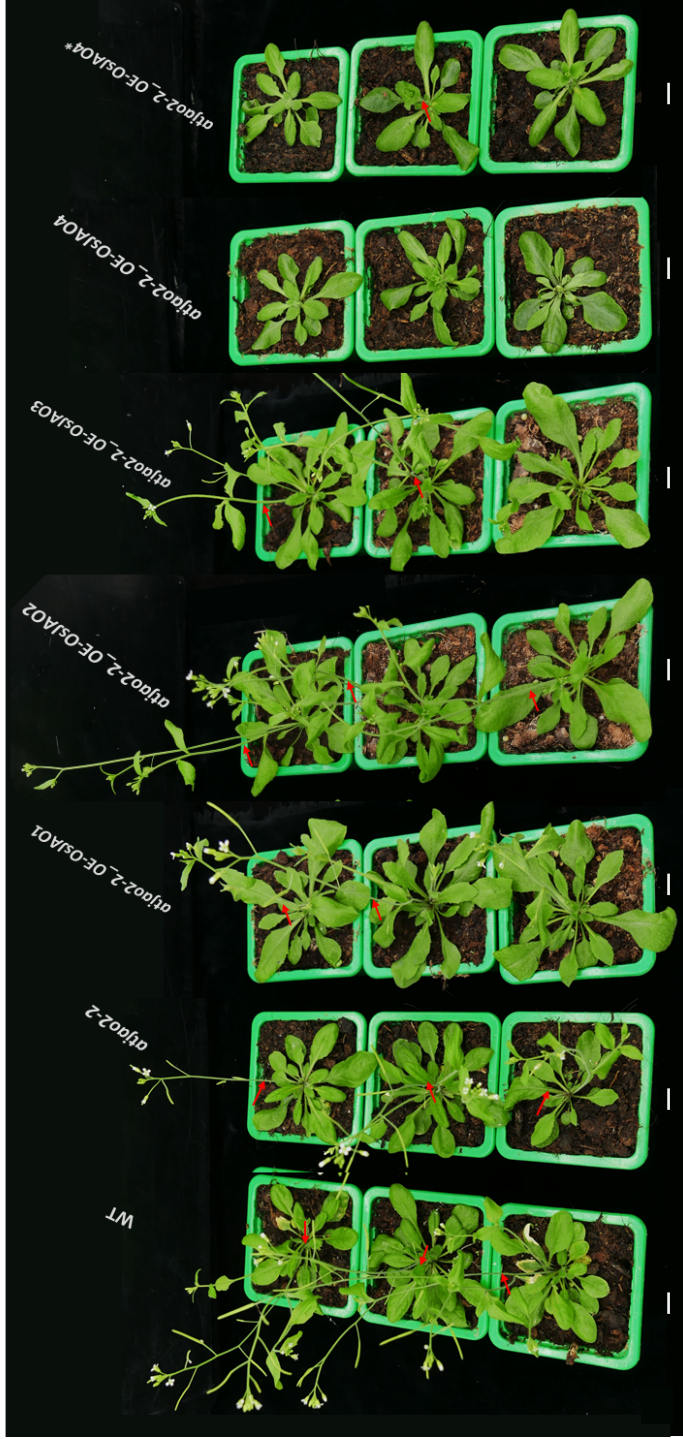


Figure II.10 : Comparaison du phénotype (floraison, stature des plantes et couleur des feuilles) de plantes d'Arabidopsis Col-0 (WT), *atjao2-2* et de mutants *atjao2-2* surexprimant les protéines OsJAOs. Les plantes transgéniques *atjao2-2_OE-OsJAO** sont en génération T2. Elles ont été photographiées après 24 jours de culture. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

dans 3 lignées indépendantes de plantes transgéniques (Figure II.9). Le niveau d'expression du marqueur de défense JA-dépendant *AtPDF1.2* a également été analysé par RT-qPCR pour évaluer le niveau de signalisation JAs. Comme décrit par Smirnova et al. (2017), *AtPDF1.2* présente des niveaux d'expression élevés chez le mutant *atjao2-2* alors que chez les plantes Col-0, les niveaux d'expression sont très faibles dans cette expérience menée sur des plantes non stressées. Chez les plantes *atjao2-2* surexprimant *OsJAO1*, *OsJAO2* ou encore *OsJAO3*, l'expression forte de *AtPDF1.2* est perdue et est d'ailleurs similaire au niveau d'expression chez WT. Ce résultat indique que l'expression de chacune de ces trois JAOs de Riz permet de pallier l'absence de AtJAO2 et réprimer la signalisation JA constitutive. Ces données confirment donc que l'expression de OsJAO1, OsJAO2 ou OsJAO3 chez Arabidopsis modifie la signalisation JA, très probablement par oxydation de JA, et pourraient, comme AtJAO2, être impliquées dans le détournement du flux métabolique de JA chez le Riz. De manière inattendue, on observe également une perte de l'expression forte de *AtPDF1.2* chez les plantes *atjao2-2* surexprimant les transgènes *OsJAO4* et *OsJAO4S*, alors que les protéines codées s'étaient révélées inactives dans le test d'hydroxylation *in vitro*. OsJAO4, tout comme sa variante OsJAO4 :p.308T>S, est donc bien capable de pallier l'absence de AtJAO2 et réprimer la signalisation constitutive JAs chez *atjao2-2*. Cela indique d'une part, que OsJAO4 est très probablement une « JA Oxidase » au même titre que OsJAO1, OsJAO2 et OsJAO3. L'activité JAO semble bien être compatible avec une thréonine comme un des résidus (RxS/T) de liaison à l'oxoglutarate. D'autre part, cela suggère que l'absence d'activité de la protéine OsJAO4 observée est peut-être due à des conditions expérimentales non optimales lors de sa production et du test *in vitro* réalisé pour sa version native ou mutée OsJAO4 :p.308T>S.

Les résultats des tests d'activité *in vitro* et des expériences de complémentations de la fonction de AtJAO2 indiquent globalement que les 4 orthologues des JAOs identifiés chez le Riz exercent la même fonction biochimique d'hydroxylation du JA en OH-JA que les JAO d'Arabidopsis. Chez le Riz, ces JAOs pourraient, tout comme chez Arabidopsis, être impliquées dans le catabolisme du JA et le détournement de flux de JAs pour prévenir la formation de l'hormone bioactive JA-Ile.

Nous avons par ailleurs observé fortuitement que la surexpression ectopique de OsJAO4 chez les plantes T1 *atjao2-2_OE-OsJAO4* et *atjao2-2_OE-OsJAO4S* (Annexe II.2), en plus de supprimer la signalisation constitutive opérant chez le mutant *atjao2-2*, est accompagnée d'un phénotype développemental bien particulier. Ce dernier est manifesté par une couleur des feuilles plus foncée, une stature rabougrie, et une floraison bien plus tardive que les mutant *atjao2-2* parental et les plantes sauvages Col-0 (Figure II.10, Annexe II.2). Ce phénotype semble être spécifiquement lié à la présence des protéines OsJAO4 et OsJAO4:p.308T>S puisque aucune des 3 autres *OsJAOs* surexprimées n'induit ce phénotype. Une possibilité serait que la protéine OsJAO4 exerce, en plus de la fonction d'hydroxylation du JA, une fonction supplémentaire jusqu'ici insoupçonnée, et qui reste à explorer.

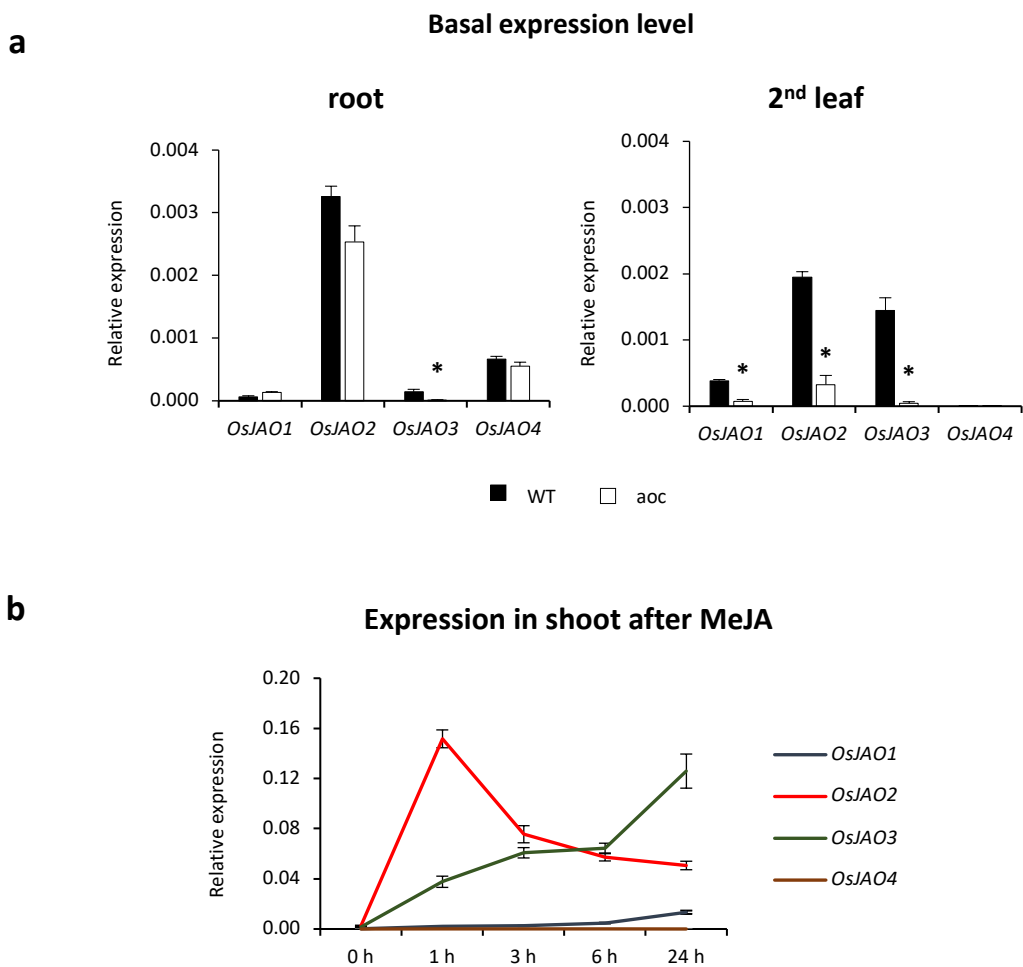


Figure II.11 : Profil d'expression des 4 gènes codant pour les JAOs de Riz.

a. Expression relative des *OsJAOs* en absence de tout stimulus dans les racines et la 2^{ème} feuille de plantes de Riz sauvages (WT) ou de plantes déficientes en JAs (*aoc*). **b.** Expression relative des *OsJAOs* dans les feuilles de plantes de Riz sauvages (WT) en réponse à un traitement MeJA. Les plantes ont été exposées aux vapeurs de MeJA déposé sur un coton-tige dans des boîtes Magenta fermées pendant les durées indiquées. Le niveau d'expression des gènes cibles est déterminé par rapport au celui des gènes de référence *UBQ5* et *UBQ10*. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de 3 répétitions biologiques. Les astérisque indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

2. Profils d'expression des gènes *OsJAOs*

L'analyse phylogénétique, les tests enzymatiques et la complémentation génétique de *atjao2-2* démontrent l'existence, dans le génome du Riz, de 4 gènes codant des JAOs actives. La démonstration de l'expression d'au moins un de ces gènes *OsJAOs* dans les tissus de la plante reste une condition *sine qua non* pour affirmer l'existence d'une voie catabolique JAO fonctionnelle chez le Riz. Chez *Arabidopsis*, il est d'ailleurs connu que l'importance physiologique des différentes isoformes est conditionnée par leur niveau d'expression et leur spécificité tissulaire en conditions de croissance optimale (Smirnova et al., 2017). Il devient alors important de déterminer les profils d'expression de chacune des *OsJAOs* pour pouvoir spéculer sur la contribution de chacun dans le métabolisme du JA chez le Riz.

a. Expression basale

L'analyse, par RT-qPCR, de l'expression basale des 4 *OsJAOs* dans les racines de plantes sauvages de Riz révèle une expression extrêmement faible de *OsJAO1* et *OsJAO3* (Figure II.11.a). Dans cet organe, *OsJAO2* et *OsJAO4* sont les seules qui semblent réellement s'exprimer, avec un niveau d'expression nettement plus élevé de *OsJAO2*. Dans les feuilles des plantes sauvages, *OsJAO2* reste l'isoforme la mieux exprimée, suivie de *OsJAO3*, puis de *OsJAO1*. L'expression de *OsJAO4* n'est toutefois pas détectée dans les feuilles. Il apparaît ainsi, dans les racines comme dans les feuilles, une certaine hiérarchie dans l'expression des *OsJAOs* dans laquelle *OsJAO2* est à chaque fois l'isoforme la plus exprimée. Lorsque la même analyse est effectuée sur des ARN du mutant *aoc*, totalement déficient en JAs, on observe une baisse significative du niveau d'expression basale des *OsJAOs* dans les feuilles. Dans les racines, les *OsJAOs* présentent des niveaux d'expression globalement similaires chez le mutant *aoc* et les plantes sauvages. Cela signifie que contrairement aux racines, l'expression des *OsJAOs* dans les feuilles nécessite une voie JA intacte, en l'absence de stimulus externe.

b. Régulation par la signalisation JA

Hormis l'expression basale des *OsJAOs*, leur réponse à l'application externe de MeJA a également été évaluée dans les feuilles où leur expression semble être plus sensible aux JAs. Il est effectivement connu que les gènes qui codent pour des enzymes de biosynthèse ou de catabolisme des JAs sont positivement régulés par la signalisation JAs elle-même (Wasternack et al., 2006). D'une part, cette régulation permet d'amplifier la signalisation JAs induite en boostant la biosynthèse de l'hormone active. Par l'induction des gènes de catabolisme, elle permet d'autre part de maintenir un turnover constant des JAs pour assurer une homéostasie de l'hormone bioactive, JA-Ile (Heitz et al., 2019; Marquis et al., 2020). L'application de vapeurs de MeJA sur les plantes permet de simuler cette signalisation JAs et de voir à quel point l'avènement de celle-ci, causée dans la nature par différents stress biotique et abiotique, peut affecter l'expression des *OsJAOs*. Hormis *OsJAO4*, dont l'expression reste indétectable dans les feuilles, les 3

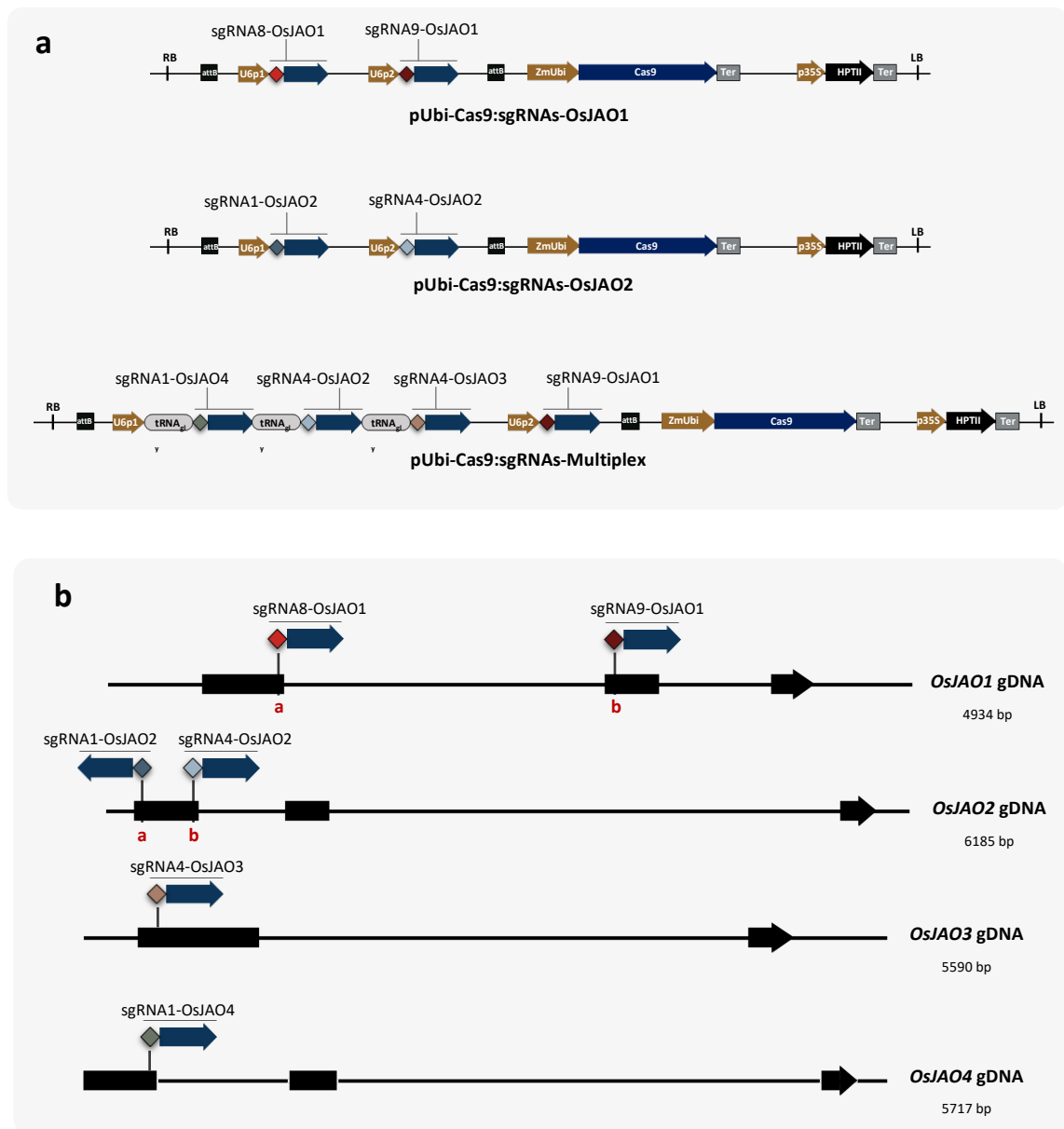


Figure II.12 : **Constructions plasmidiques CRISPR-Cas9 utilisées pour la production des mutants *jaos* et la position des séquences ciblées par chacun des ARN guides (sgRNAs) sur les gènes *OsJAOs*.**

a. Cartes graphiques de l'ADN-T des trois constructions ayant servi à l'expression de la machinerie de mutagenèse CRISPR-Cas9 (Cas9 et ARNg) pour la production des mutants simples *jao1* et *jao2* et des mutants multiples *jaoM*. Sur les constructions pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1 et pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2, les deux sgRNAs sont placés sous le contrôle de deux promoteurs Ubiquitin-6 différents (U6p1 et U6p2). Sur la construction pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex, le multiplex de sgRNA-tRNA^{gly}(x3), est placé sous le contrôle du promoteur U6p1 et le quatrième sgRNA placé sous le contrôle du promoteur U6p2. **b.** Carte graphique des gènes *OsJAO1*, *OsJAO2*, *OsJAO3* et *OsJAO4* et la position des sites ciblés par chacun des sgRNAs sur ces gènes *OsJAOs*. Les traits continus représentent les séquences non-codantes des gènes et les cases noires les exons. bp : base pair.

autres *OsJAOs* voient leur expression induite par l'application de MeJA (Figure II.11.b). L'induction de *OsJAO1* est toutefois très faible et tardive comparée à celle de *OsJAO2* et *OsJAO3* qui montrent des niveaux d'expression très élevés. *OsJAO2* est le gène le plus rapidement induit avec un maximum d'expression dès 1 h pour décroître progressivement jusqu'à 24 h. L'induction de *OsJAO3* est plus progressive et son maximum d'expression n'est atteint que 24 h.

3. Production de mutants ko pour les gènes *OsJAOs* par édition du génome

L'expression des *OsJAOs* dans les tissus des plantes de Riz soutient l'existence d'une voie JAO fonctionnelle pour laquelle on peut spéculer que les quatre acteurs identifiés ne sont pas tous impliqués au même degré. L'exploration de ces hypothèses nécessite la mise en place d'une approche de génétique inverse par l'utilisation des mutants ko pour un, plusieurs ou la totalité des gènes *OsJAOs*. Cela permettrait d'étudier l'impact physiologique de la suppression partielle ou complète de cette voie potentielle de catabolisme du JA chez le Riz. Il existe différentes ressources publiques plus ou moins accessibles proposant des mutants ko pour une large variété de gènes de Riz (Krishnan et al., 2009; Li et al., 2017). Néanmoins, il n'a pas été possible de trouver une ressource qui propose des mutants simples ko pour chaque gène *OsJAOs* et le fait que différentes variétés de Riz aient été utilisées pour générer ces collections, rend impossible l'exploitation de mutants d'origines différentes. De plus, dans ces ressources publiques, on retrouve rarement des mutants ko exclusivement pour nos gènes d'intérêt. Ils présentent généralement d'autres mutations dont les conséquences sur le phénotype de la plante peuvent rendre l'interprétation de l'inactivation des gènes d'intérêt bien difficile. Pour pallier à ces limitations, nous avons décidé de produire les mutants *osjao* en utilisant la stratégie de mutagenèse CRISPR-Cas9. Celle-ci a pour avantage de permettre l'introduction de mutations ciblées sur un gène ou, de manière simultanée, sur plusieurs gènes et celles-ci stabilisées en seulement trois générations de plantes (ou moins). Ces travaux de mutagenèse ont été réalisés en collaboration avec le Dr Antony Champion, Directeur de Recherche à l'IRD de Montpellier, dans l'équipe DIADE (Unité CERES). En effet, au sein de cette équipe, une expertise dans la transformation génétique de plantes de Riz et la production de mutants CRISPR-Cas9 est développée et maintenue depuis quelques années. C'est notamment dans cette équipe que le nouveau mutant *aoc* a été produit dans le cultivar Kitaake (*O. sativa* ssp *japonica*). J'ai alors rejoint l'équipe DIADE pour un séjour de 3 mois afin d'initier la production des mutants ko pour les différents *OsJAOs* de Riz suivant une procédure qui comprend principalement trois étapes.

- **Etape 1** : Assemblage de constructions plasmidiques codant la machinerie CRISPR-Cas9
- **Etape 2** : Transformation des cals, régénération et sélection des plantes mutées (T0)
- **Etape 3** : Identification parmi les plantes de la T1 et la T2 des mutants *jao* stables Cas9-free

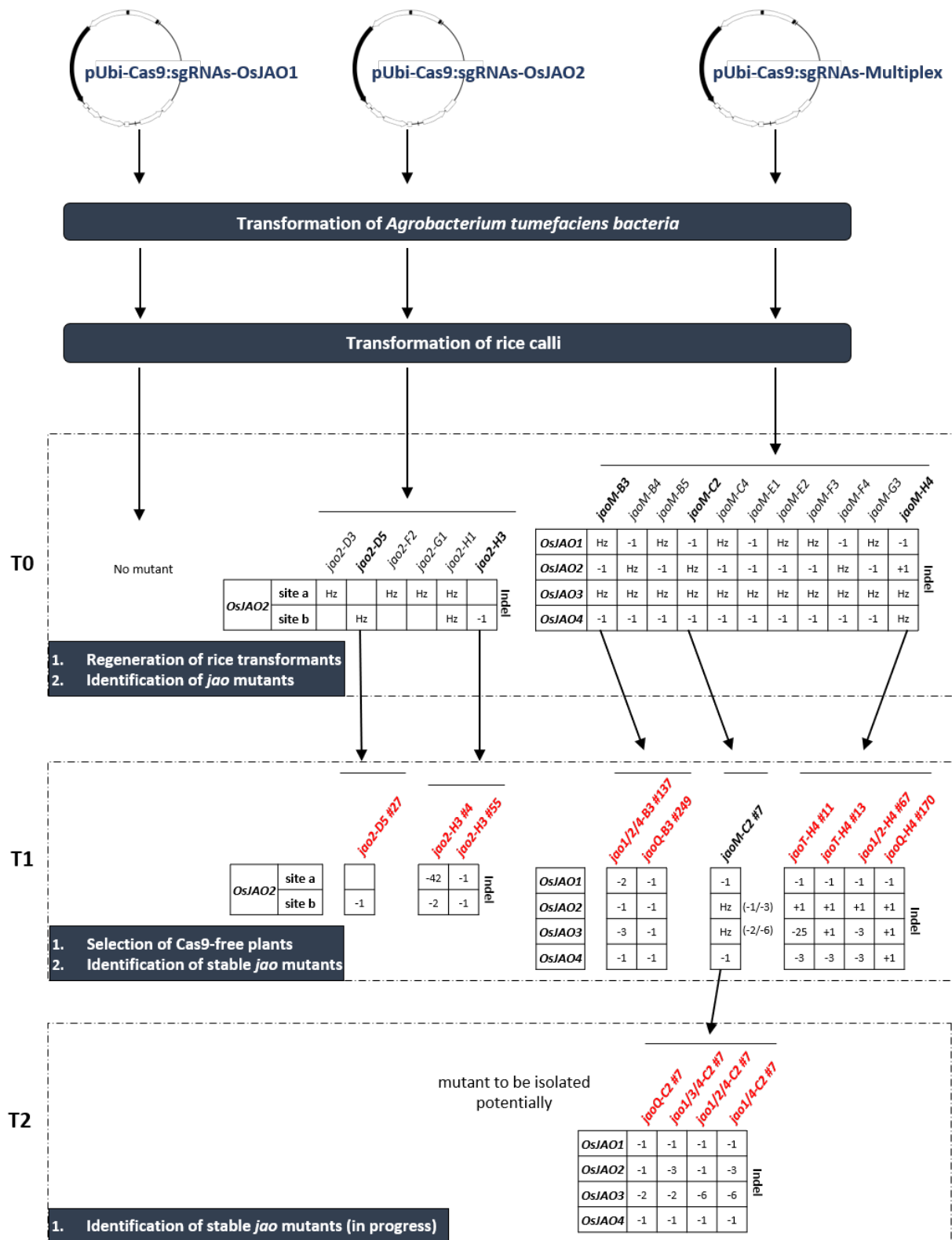


Figure II.13 : Synthèse des différentes étapes expérimentales ayant mené à la production de mutants *jao* stables et dépourvus de l'ADN-T codant la machinerie CRISPR-Cas9 (« Cas9-free »).

Après assemblage, les plasmides pUbi-Cas9 qui contiennent les ARNg ciblant les gènes d'intérêt sont transférés dans des bactéries *A. tumefaciens*. Les bactéries transformées sont par la suite utilisées pour transformer des cals embryogènes de Riz. Les cals transformés sont isolés grâce à leur résistance à l'hygromycine et régénérés en plantes (T0) parmi lesquelles on identifiera celles qui ont des mutations intéressantes sur les gènes *OsJAOs*. Les graines de ces plantes mutées sont semées pour obtenir la génération T1 des mutants où on identifie parmi les mutants Cas9-free ceux ayant stabilisé les mutations (homozygotes) observées chez leur parent en T0. Les mutants Cas9-free dont les mutations ne sont pas stabilisées peuvent être analysés en T2 pour y identifier des individus présentant des mutations stables. Indel : Insertion ou Délétion de nucléotide(s). En gras : les lignées à génotyper pour l'identification de mutants; En rouge : mutants stables Cas9-free.

a. Assemblage des constructions plasmidiques

Cela consiste principalement en l'assemblage et le clonage des plasmides qui portent l'ADN-T codant pour la nucléase Cas9 et des différents ARN guides (ARNg ou sgRNAs) qui dirigent la nucléase sur le(s) gène(s) cible(s) à muter. Cette étape a été exclusivement menée à l'IBMP, avant mon déplacement à Montpellier. Dans le cas idéal, on aurait voulu générer plusieurs constructions plasmidiques permettant de produire des mutants ko quadruples, triples, doubles et simples pour les quatre gènes *OsJAOs* identifiés afin d'étudier au mieux l'impact physiologique de l'inactivation unique ou combinée de chacune des isoformes *OsJAOs*. Le personnel nécessaire au suivi et la surface de culture étant limitants à l'IRD de Montpellier, nous avons décidé, en accord avec nos collègues sur place, de travailler avec seulement 3 constructions afin d'assurer un suivi optimal des transformants à générer (Figure II.12.a). Parmi ces constructions, on compte le plasmide « **pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex** » dont l'ADN-T code, en plus de la nucléase Cas9, **4 ARNg ciblant chacun un des gènes *OsJAOs***. L'expression de ces ARNg dans les cellules de plantes de Riz permettrait d'induire des mutations sur tous les gènes *OsJAOs* ou seulement certains pour causer l'inactivation simultanée de plusieurs de ces gènes sinon de tous. Les deux autres constructions assemblées sont les plasmides « **pUbi-Cas9:sgRNAs-*OsJAO1*** » et « **pUbi-Cas9:sgRNAs-*OsJAO2*** » conçus pour cibler et muter les gènes *OsJAO1* et *OsJAO2* respectivement. Les T-DNA de chacun de ces 2 plasmides codent pour deux ARNg qui ciblent des séquences différentes présentes chez *OsJAO1* sur l'exon 1 et l'exon 2 et chez *OsJAO2* sur l'exon 1 uniquement (Figure II.12.b). La décision de produire des mutants ko simples pour ces deux gènes plutôt que les autres est motivée par le fait que les gènes *OsJAO1* et *OsJAO2*, contrairement à ce que montrent les données d'expression illustrées dans ce manuscrit, étaient les gènes les mieux exprimés dans les feuilles sur nos premières analyses d'expression par RT-qPCR. Le niveau d'expression basale de *OsJAO3* avait longtemps été sous-évalué à cause d'une faible efficacité d'amplification des premières amorces utilisées. Les données d'expression les plus récentes auraient été plus cohérentes avec la production de mutants ko simples pour *OsJAO2* et *OsJAO3*, pour voir si leur expression basale plus forte reflète réellement leur importance physiologique dans ce pathway JAO. Néanmoins, cette question peut être adressée en utilisant différentes combinaisons de mutants ko doubles (*jao1/2*, *jao1/3* et *jao2/3* par exemple) qui peuvent potentiellement être générés avec la construction « pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex ». Une fois tous les plasmides assemblés, chacune de ces trois constructions a été transférée dans des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* utilisées par la suite pour la transformation génétique des cals de Riz.

b. Transformation génétique des cals, régénération et sélection des plantes mutées

Ces étapes de transformation génétique de cals de Riz et leur régénération en plantes ont été entièrement réalisées à l'IRD de Montpellier. Pour chacune des constructions, les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* transformées sont mises en culture puis co-incubées avec des cals embryogènes de Riz afin

de provoquer le transfert et l'intégration de l'ADN-T du plasmide dans les cellules des cals. Après trois jours de coculture à l'obscurité, les cals sont remis en culture sur un milieu contenant de l'hygromycine. Ce milieu permet de sélectionner sur les cals, les cellules ayant acquis la résistance à l'hygromycine par l'intégration de l'ADN-T. Seules les cellules transformées se multiplient dans ce milieu sélectif pour reformer un nouveau cal. Après quelques semaines de culture à l'obscurité, les cals résistants à l'hygromycine (Hygro^R) sont mis en lumière et régénérés en plantes grâce à un changement de balance hormonale. Les plantes transformées qui sont bien développées sont ensuite transférées en terre pour constituer la génération T0 des transformants. Au total, 6 plantes transformées avec l'ADN-T du plasmide « **pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1** » (lignées *jao1*), 6 avec l'ADN-T du plasmide « **pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2** » (lignée *jao2*), et 23 avec l'ADN-T du plasmide « **pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex** » (lignées *jaoM*) ont été régénérées. Sur chacune de ces plantes transformées, on a cherché à détecter des mutations induites sur les gènes ciblés d'abord par une analyse « high resolution melt » HRM avant de déterminer la nature précise des mutations par séquençage Sanger (voir matériel et méthodes).

De manière assez surprenante, aucune mutation n'a été détectée sur le gène *OsJAO1* des plantes *jao1*, et ceci sur les deux sites ciblés par les ARNg. Il semblerait que la machinerie de mutagenèse CRISPR-Cas9, présente dans ces plantes, pour une raison inconnue, ne soit pas fonctionnelle puisque la présence de l'ADN-T a bien été confirmée par PCR. Chez les plantes *jao2* et *jaoM*, la machinerie CRISPR-Cas9 semble très bien fonctionner. Toutes les 6 plantes *jao2* présentent des mutations sur le gène *OsJAO2* ciblé : la plante *jao2-H1* avec des mutations hétérozygotes sur les sites a et b, les plantes *jao2-D3*, *jao2-F2* et *jao2-G1* avec une mutation Hétérozygote (Hz) seulement sur le site a, et les plantes *jao2-H3* et *jao2-D5* présentant une mutation seulement sur le site b (Figure II.13). La nature de la mutation induite chez *jao2-H3* est inconnue puisqu'elle est hétérozygote mais on sait que chez *jao2-D5* on a une délétion d'un nucléotide sur les deux allèles du gène (homozygote). Des 23 plantes *jaoM*, 11 ont été complètement génotypées et toutes présentent des mutations sur les gènes *OsJAOs* dont certaines déjà stabilisées à l'état homozygote.

c. Identification des mutants *jao* stables « Cas9-free »

La stratégie au niveau de cette étape consiste tout d'abord à identifier, au sein de la descendance T1 des mutants T0 régénérés, les plantes dépourvues de T-DNA (plantes « Cas9-free »). L'absence de l'ADN-T permet d'exclure l'altération d'autres gènes par l'insertion de l'ADN-T mais surtout d'exclure la possibilité de nouveaux événements de mutagenèse chez ces plantes et de pouvoir se fier pleinement aux mutations qui seront observées chez celles-ci ainsi que sur leur descendance. Ensuite, parmi les plantes « Cas9-free », on recherchera en priorité les plantes qui auront stabilisé (homozygotes) les mutations causées par la machinerie CRISPR-Cas9 sur les gènes *OsJAO* toujours par une analyse HRM couplée à la méthode de séquençage Sanger. Lorsque, dans des cas moins favorables, ces mutations existent toujours

à l'état hétérozygote chez certaines plantes, leurs graines seront à nouveau propagées pour sélectionner, parmi leur descendance, les plantes ayant stabilisé ces mutations. Pour ce faire, de cette génération de plantes T0, deux plantes *jao2* (*jao2-D5* et *jao2-H3*) et 3 plantes *jaoM* (*jaoM-B3*, *jaoM-C2* et *jaoM-H4*) ont été sélectionnées afin d'isoler des mutants stables Cas9-free dans leur descendance en T1 et T2. Les graines de ces plantes ont été semées dans les serres de nos partenaires (et voisin) Allemands du Karlsruhe Institute of Technology (KIT, Karlsruhe, Allemagne) puisque qu'à l'IBMP nous ne disposons pas de conditions de culture permettant la mise à graines de plantes tropicales telles que le Riz.

i. Les mutants simples *jao2*

Sur 100 plantes T1 *jao2-D5* analysées, seules 6 sont effectivement « Cas9-free ». Celles-ci ne présentent aucune mutation sur le site a du gène *OsJAO2* comme observé précédemment chez le parent *jao2-D5*. Parmi ces 6 plantes, deux, dont ***jao2-D5* #27**, présentent une délétion d'un nucléotide homozygote (stable) au niveau du site b du gène *OsJAO2* (Figure II.13). Concernant la lignée *jao2-H3*, 39 plantes sur 102 analysées sont Cas9-free. D'une manière surprenante, on observe, sur le « site a » du gène *OsJAO2* de ces plantes, des délétions d'1 et 42 nucléotides qui n'avaient pas été détectées chez le parent T0 *jao2-H3* (Figures II.13, II.14). Il semble alors que ces mutations aient été occasionnées à un stade ultérieur à l'analyse du génotype du parent *jao2-H3*. Ces nouvelles mutations observées contribuent par ailleurs à diversifier les génotypes dans la descendance de *jao2-H3* au sein de laquelle on distingue, principalement, deux types de mutants stables Cas9-free : un petit groupe de 2 plantes, dont ***jao2-H3* #55**, délétées d'un nucléotide sur les sites a et b du gène *OsJAO2* et un groupe plus large de 11 plantes, dont ***jao2-H3* #4**, délétées de 42 nucléotides sur le site a et de 2 nucléotides sur le site b du gène *OsJAO2*. Ainsi, sur cette T1 des deux lignées *jao2*, on obtient trois types de mutant stables « Cas9-free » représentés par les plantes *jao2-D5* #27 (-1 pb), *jao2-H3* #4 (-44 pb), et *jao2-H3* #55 (-2 pb). Les délétions de 1, 2 et 44 nucléotides, observées sur le gène *OsJAO2* de ces plantes, ont la particularité d'introduire des codons stop prématurés sur la séquence codante (ORF) de *OsJAO2* donnant, après traduction, les protéines tronquées OsJAO2:p.K155Sfs*19, OsJAO2:p.Y32Tfs*1 et OsJAO2:p.K155Vfs*7&21_34del respectivement (Figures II.14, II.15). L'absence des résidus de liaison au cosubstrat 2-OG (RXS) et au cofacteur Fe²⁺ (HXD/E...X_n...H) sur ces protéines tronquées les rend inactives pour la fonction « JA Oxidase ». De ce fait, les plantes *jao2-D5* #27, *jao2-H3* #4, et *jao2-H3* #55 constituent trois allèles différents de mutant ko pour le gène *OsJAO2*.

ii. Les mutants multiples

▪ Les mutants de la lignée *jaoM-B3*

15 plantes T1 de la lignée *jaoM-B3* sur 291 analysées sont « Cas9-free ». Chez celles-ci on observe des mutations sur tous les gènes *OsJAOs* mais seules les plantes #137 et #249 présentent des mutations stables

			Mutants										
gene	indel	knock out	<i>jao2-D5</i> #27	<i>jao2-H3</i> #4	<i>jao2-H3</i> #55	<i>jao1/2-H4</i> #67	<i>jao1/2/4-B3</i> #137	<i>jaoT-H4</i> #11	<i>jaoT-H4</i> #13	<i>jaoQ-B3</i> #249	<i>jaoQ-H4</i> #170	<i>jaoM-C2</i> #7	encoded protein
<i>OsJAO1</i>	-1	yes											OsJAO1:p.L191Wfs*88
	-2	yes											OsJAO1:p.L191Gfs*63
<i>OsJAO2</i>	+1	yes											OsJAO2:p.W155Vfs*6
	-1	yes											OsJAO2:p.K155Sfs*19
	-2	yes											OsJAO2:p.Y32Tfs*1
	-3	no											OsJAO2:p.K155del
	-44	yes											OsJAO2:p.K155Vfs*7&21_34del
<i>OsJAO3</i>	+1	yes											OsJAO3:p.D62Efs*348
	-1	yes											OsJAO3:p.D62Tfs*21
	-2	yes											OsJAO3:p.P61Pfs*348
	-3	no											OsJAO3:p.61PD>H
	-6	no											OsJAO3:p.DG62del
	-25	yes											OsJAO3:p.V55Gfs*20
<i>OsJAO4</i>	+1	yes											OsJAO4:p.E158Gfs*5
	-1	yes											OsJAO4:p.E158Rfs*14
	-3	"potentially" no											OsJAO4:p.E158del

Figure II.14 : Représentation des mutations (indel) identifiées sur les gènes *OsJAOs* des différentes lignées mutantes en génération T1 et les protéines potentiellement codées par ces gènes. Les cases colorées indiquent les indel induites sur les gènes des différents mutants. En noir : indel stabilisée (Homozygote) ; En gris : Indel non encore stabilisée (Hétérozygote).

Complementation of AtJAO2 function by :

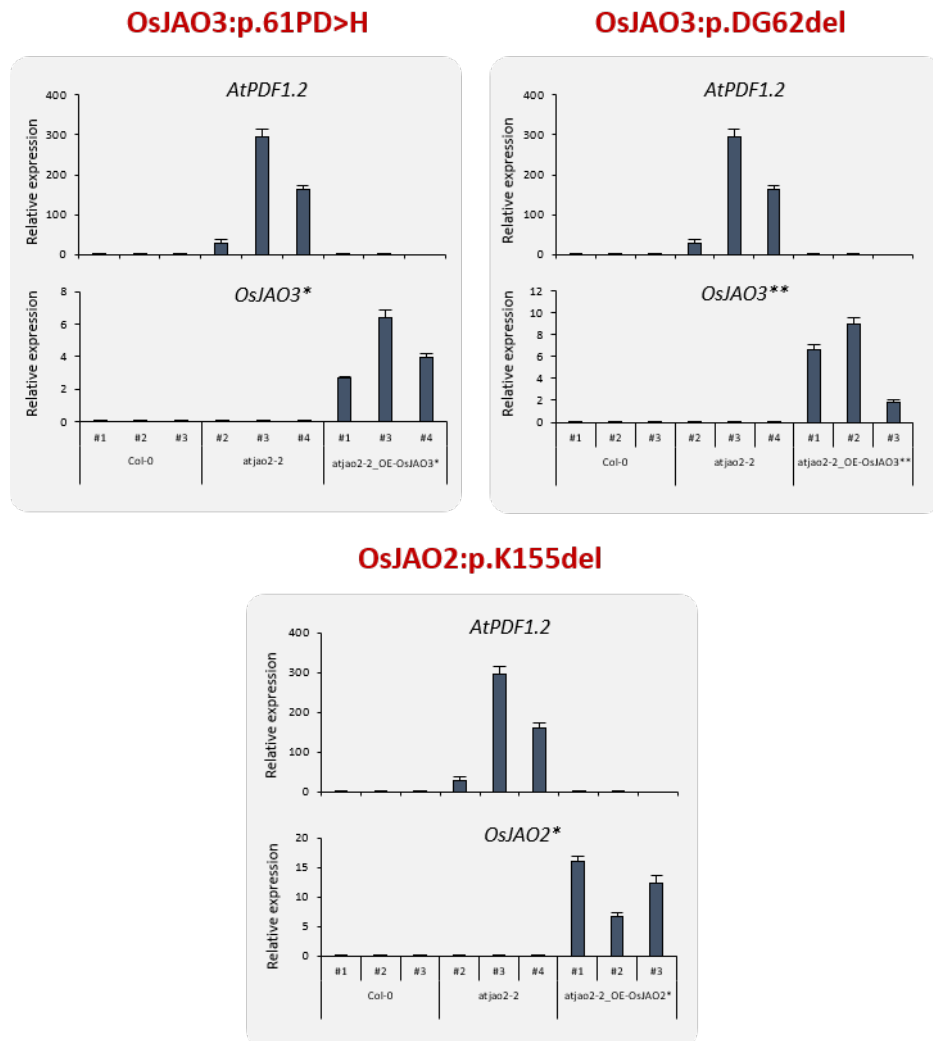


Figure II.16 : Résultats des expériences de complémentation, chez le mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis, de la fonction de AtJAO2 par les protéines mutées OsJAO2:p.K155del, OsJAO3:p.61PD>H et OsJAO3:p.DG62del.

Les CDS codant ces protéines mutées ont chacun été exprimés, de façon stable, avec un promoteur 35S chez le mutant *atjao2-2*. Les ARN de ces mutants *atjao2-2* transformés avec ces transgènes *OsJAOs*, de plantes Col-0 et de mutants *atjao2-2* ont été analysés en RT-qPCR pour confirmer l'expression des transgènes *OsJAOs* et comparer chez les différents génotypes l'expression *AtPDF1.2* utilisé comme marqueur de la signalisation JAs. Le niveau d'expression des gènes cibles est déterminé par rapport au celui des gènes de référence *EXP* et *TIP41*. *OsJAO2** : CDS codant pour OsJAO2:p.K155del ; *OsJAO3** : CDS codant pour OsJAO3:p.61PD>H ; *OsJAO3*** : CDS codant pour OsJAO3:p.61PD>H.

sur l'ensemble des gènes *OsJAOs* (Figure II.13). Les délétions d'un nucléotide observées sur chacun des 4 gènes *OsJAOs* de la plante #249 occasionnent des codons stop prématurés sur l'ORF de ces gènes qui codent, par conséquent, pour les protéines tronquées OsJAO1:p.L191Wfs*88, OsJAO2:p.K155Sfs*19, OsJAO3:p.D62Tfs*21 et OsJAO4:p.E158Rfs*14 (Figures II.13, II.14, II.15). Ces protéines sont toutes inactives pour la fonction « JA Oxidase » du fait de l'absence des résidus de liaison au cosubstrat 2-OG et au cofacteur Fe²⁺. De ce fait, la plante #249, ko pour les quatre *OsJAOs* de Riz, est nommée ***jaoQ-B3 #249***. La plante #137, quant à elle, présente des délétions d'un nucléotide sur les gènes *OsJAO2* et *OsJAO4* et de deux nucléotides sur le gène *OsJAO1* qui font que ces gènes codent pour les protéines tronquées OsJAO1:p.L191Gfs*63, OsJAO2:p.K155Sfs*19 et OsJAO4:p.E158Rfs*14 également inactives (Figures II.13, II.14, II.15). La délétion de 3 bases sur le gène *OsJAO3* de cette plante #137 cause, quant à elle, la mutation des 2 résidus P₆₁ et D₆₂ en H₆₁ sur la protéine OsJAO3:p.61PD>H qui en résulte sans affecter les résidus essentiels à la fonction « JA Oxidase ». Cette structure est en accord avec la capacité de cette protéine OsJAO3 :p.61PD>H mutée à compléter la déficience de AtJAO2, comme la protéine OsJAO3 native, lorsqu'elle est surexprimée chez le mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis, en reversant l'expression du marqueur *AtPDF1.2* au niveau du WT (Figure II.16). Ainsi, la plante #137, ko pour les gènes *OsJAO1*, *OsJAO2* et *OsJAO4*, est nommée ***jao1/2/4-B3 #137***.

- **Les mutants de la lignée *jaoM-H4***

11 plantes T1 issues de la lignée T0 *jaoM-H4* (sur 222 analysées) sont « Cas9-free » dont 7 avec des mutations stables sur l'ensemble des gènes *OsJAOs* (Figure II.13). La plante #170 de cette lignée *jaoM-H4* est ko pour les 4 gènes *OsJAOs* puisqu'elle présente une délétion d'une base sur *OsJAO1* et une insertion d'une base sur *OsJAO2*, *OsJAO3* et *OsJAO4* qui occasionnent l'absence des résidus de liaison au cosubstrat 2-OG et au cofacteur Fe²⁺ sur les protéines OsJAO1:p.L191Wfs*88, OsJAO2:p.W155Vfs*6, OsJAO3:p.D62Efs*348 et OsJAO4:p.E158Gfs*5 codées par ces gènes (Figures II.13, II.14, II.15). De ce fait, la plante #170, ko pour les quatre *OsJAOs*, est nommée ***jaoQ-H4 #170***. La plante #13, présente les mêmes délétions sur les gènes *OsJAO1*, *OsJAO2* et *OsJAO3* que le mutant *jaoQ-H4 #170* et est donc ko pour ces trois gènes. Sur le dernier gène *OsJAO4*, cette plante #13 présente une délétion de 3 nucléotides qui entraîne la perte du résidu E₁₅₈ sur la protéine OsJAO4:p.E158del codée. La présence des résidus essentiels à la fonction « JA Oxidase » sur cette protéine suggère qu'elle est toujours active (Figure II.15). Toutefois, la capacité de cette protéine OsJAO4:p.E158del à compléter la fonction de AtJAO2 n'a pu être vérifiée puisque la protéine OsJAO4 native était considérée à cette période comme inactive, sur la base des résultats des tests enzymatique *in vitro*. Ainsi, la plante #13, ko pour les gènes *OsJAO1*, *OsJAO2* et *OsJAO3*, est nommée ***jaoT-H4 #13***. La plante #11 présente les mêmes mutations sur les gènes *OsJAOs* que le mutant *jaoT-H4 #13* à l'exception du gène *OsJAO3* où elle présente une délétion de 25 nucléotides. Cette large délétion sur *OsJAO3* occasionne elle aussi l'absence des résidus de liaison au cosubstrat 2-OG et au cofacteur Fe²⁺ sur la protéine OsJAO3:p.V55Gfs*20 codée

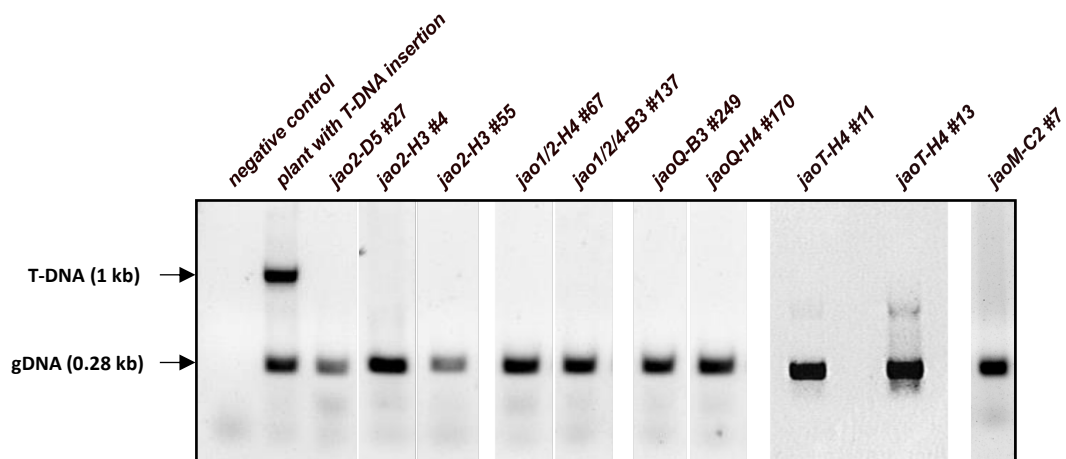


Figure II.17 : Vérification de l'absence du T-DNA codant la machinerie CRISPR-Cas9 chez les mutants *jao* de la génération T1.

Les extraits d'ADN des mutants ont été analysés par une PCR-multiplex qui inclue un couple d'amorces spécifiques au T-DNA pour vérifier son absence dans chaque extrait et un couple d'amorces spécifiques au gène *OsJAOI* qui permet de confirmer la présence d'ADN génomique (gDNA) et d'exclure un faux négatif. Une réaction PCR sans ADN est présentée ici comme control négatif. L'extrait d'une plante transformée (T0) a été utilisé pour illustrer la présence du T-DNA dans un extrait d'ADN.

(Figure II.15). De ce fait, la plante #11 est ko pour les gènes *OsJAO1*, *OsJAO2* et *OsJAO3* comme le mutant *jaoT-H4* #13 et est nommée par conséquent ***jaoT-H4* #11**. Enfin, la plante #67 qui présente les mêmes mutations que le mutant *jaoQ-H4* #170 sur les gènes *OsJAO1* et *OsJAO2*, est aussi ko pour ces deux gènes. Les protéines OsJAO3:p.61PD>H et OsJAO4:p.E158del codées respectivement par les gènes *OsJAO3* et *OsJAO4* de cette plante #67 seraient quant à elle toujours actives puisque les délétions induites n'affectent pas les résidus requis pour la fonction « JA Oxidase ». De ce fait, cette plante #67, ko seulement pour les gènes *OsJAO1* et *OsJAO2*, est nommée ***jao1/2-H4* #67** et vient enrichir la collection de mutants ko *jaos*.

▪ **Les mutants de la lignée *jaoM-C2***

La dernière lignée *jaoM-C2* présente 3 plantes T1 « Cas9-free » sur 85 analysées dont aucune avec des mutations stabilisées sur l'ensemble des gènes *OsJAOs* (Figure II.13). Parmi les plantes « Cas9-free », on compte la plante #7 chez laquelle les gènes *OsJAO1* et *OsJAO4*, délétés tous les deux d'un nucléotide, codent pour les protéines OsJAO1:p.L191Wfs*88 et OsJAO4:p.E158Rfs*14 dépourvues des résidus de liaison au cosubstrat 2-OG et au cofacteur Fe²⁺, donc inactives pour la fonction « JA Oxidase » (Figures II.13, II.14, II.15). Sur les gènes *OsJAO2* et *OsJAO3*, cette plante *jaoM-C2* #7 présente des mutations hétérozygotes qui, analysées en détail avec l'outil ICE-Synthego (Conant et al., 2022), se révèlent être très intéressantes. En effet, les deux allèles du gène *OsJAO2* présentent des délétions de 1 et de 3 nucléotides et ceux du gène *OsJAO3* présentent des délétions de 2 et de 6 nucléotides. Les protéines OsJAO2:p.K155Sfs*19 et OsJAO3:p.P61Pfs*348 qui résultent de la délétion de 1 et 2 nucléotides respectivement sur les gènes *OsJAO2* et *OsJAO3* seraient inactives du fait de l'absence des résidus de liaisons au cosubstrat 2-OG et cofacteur Fe²⁺. Cependant, sur les protéines OsJAO2:p.K155del et OsJAO3:p.DG62del qui résultent des délétions de 3 et 6 nucléotides respectivement sur les gènes *OsJAO2* et *OsJAO3*, aucun des résidus essentiels à la fonction « JA Oxidase » n'est affecté. Cela explique d'ailleurs leur capacité à compléter la fonction de AtJAO2 lorsqu'elles sont surexprimées chez le mutant *atjao2-2* (Figure II.16). Sur la base de ces observations, les graines de ce mutant *jaoM-C2* #7 ont été semées pour espérer isoler sur la T2 les mutants *jao1/4-C2* #7, *jao1/2/4-C2* #7, *jao1/3/4-C2* #7 et *jaoQ-C2* #7 qui seraient de bons compléments de notre collection de mutant *jao* déjà existante.

En somme, malgré l'inefficacité de la construction pUbi-Cas9:sgRNAs-*OsJAO1*, nous sommes parvenus, avec les constructions pUbi-Cas9:sgRNAs-*OsJAO2* et pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex, à produire une large collection de mutants homozygotes « Cas9-free » ko pour le gène *OsJAO2* ou simultanément pour deux, trois ou les 4 gènes *OsJAO* (Figure II.17). Parmi ces mutants on compte :

- ✓ trois mutants alléliques ***jao2*** indépendants: *jao2-D5* #27, *jao2-H3* #4, *jao2-H3* #55
- ✓ un mutant double ***jao1/2*** : *jao1/2-H4* #67
- ✓ un mutant triple ***jao1/2/4*** : *jao1/2/4-B3* #137

		JAs content (pmol g ⁻¹ of fresh weight)					
		JA	JA-Ile	12OH-JA-Ile	12COOH-JA-Ile	12COOH-JA	OH-JA
Shoot	WT	14.0 ± 2.4	1.8 ± 1.8	21.3 ± 2.0	141.1 ± 11.2	55.8 ± 7.1	n.d
	<i>jao2-D5</i> #27	49.1 ^{**} ± 5.7	7.7 [*] ± 0.6	8.7 [*] ± 2.3	128.7 ± 12.7	96.3 [*] ± 8.7	n.d
	<i>jaoQ-B3</i> #249	79.0 ± 25.6	32.7 ± 16.2	28.8 ± 11.9	441.4 ^{**} ± 71.6	181.7 ^{**} ± 11.0	n.d
Root	WT	1.7 ± 0.9	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	9.5 ± 2.4	n.d	n.d
	<i>jao2-D5</i> #27	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.5	9.8 ± 1.7	n.d	n.d
	<i>jaoQ-B3</i> #249	1.5 ± 0.3	1.3 ± 1.3	1.4 ± 0.4	18.7 ± 4.6	n.d	n.d

Tableau II.2 : Analyse du profil des JAs dans les racines et les feuilles de plantes sauvages (WT) et des mutants *jao2-D* #27 et *jaoQ-B3* #249 de la génération T2.

Les feuilles et les racines utilisées ont été collectées séparément de plantules âgées de 9 jours. Les JAs ont par la suite été extraits des deux tissus puis quantifiés après analyse des extraits en LC-MS/MS. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 3 répétitions biologiques. Les astérisques indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs de chaque mutant comparée à celles des WT (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). n.d : non détecté.

- ✓ deux mutants triples *jao1/2/3 (jaoT)* indépendants: *jao1/2/3-H4 #11* et *jao1/2/3-H4 #13*
- ✓ 2 mutants quadruples *jaoQ* indépendants: *jaoQ-B3 #249* et *jaoQ-H4 #170*

4. Détermination du rôle physiologique de la voie JAO chez le Riz

A l'exception des mutants de la lignée *jaoM-C2* en cours de génotypage en T2, l'ensemble des mutants obtenus ont été soumis à des analyses métaboliques, transcriptionnelles et phénotypiques en comparaison avec le référent WT. Chacune de ces analyses vise à déterminer l'impact de l'inactivation des *OsJAOs* sur le métabolisme des Jasmonates, le niveau de signalisation JAs, les réponses de défenses JA-dépendantes ainsi que sur la croissance chez le Riz. L'interprétation des données découlant de ces analyses nous permettront tout d'abord de pouvoir confirmer l'existence d'une voie JAO fonctionnelle chez le Riz et, surtout, de révéler l'importance que revêt cette voie JAO dans le contrôle de l'homéostasie de l'hormone biactive JA-Ile ainsi que son rôle dans la régulation du développement et la réponse à différents stress environnementaux chez le Riz. De plus, la comparaison des données des mutants simples, double, triples et quadruples pour les 4 *OsJAOs* permettra, en plus, de préciser l'importance de chaque isoforme dans le fonctionnement de cette voie JAO.

a. Importance de la voie JAO dans le métabolisme des JAs

Sur la base du modèle mécanistique déterminé chez *Arabidopsis* (Smirnova et al., 2017; Marquis et al., 2022), nous avons supposé que des tissus foliaires non stimulés seraient le meilleur matériel pour investiguer l'impact de l'absence de différentes *OsJAO* sur le fonctionnement basal de la voie JA chez le Riz. Un premier profil métabolique des Jasmonates a été déterminé par LC-MS/MS dans les racines et les feuilles du mutant simple *jao2-D5 #27*, du mutant quadruple *jaoQ-B3 #249* ainsi que chez le référent WT. Pour ce faire, des extraits méthanoliques de plantules de 9 jours ont été analysés en LC-MS/MS, pour doser les niveaux d'accumulation de JA et de OH-JA, respectivement substrat et produit enzymatique des JAO, ainsi que les niveaux d'accumulation de JA-Ile et de ses dérivés oxydés. Sur cette expérience, la comparaison du profil des JAs définis dans les racines des WT et des deux mutants ne révèle aucune différence significative entre les génotypes alors que dans les feuilles, les deux mutants présentent globalement des teneurs en JAs, JA-Ile et de ces catabolites plus importantes que le WT (Tableau II.1). Cette différence dans les feuilles entre le WT et les mutants est d'autant plus marquée pour le 12COOH-JA, l'un des catabolites les plus stables, qui s'accumule de l'ordre de 2 fois plus chez *jao2-D5 #27* et 4 fois plus *jaoQ-B3 #249* comparé au WT. Il apparaît donc que l'inactivation de JAO2 ou des quatre JAO chez le Riz influence le profil des JAs en absence même de tout stress. Cela révèle l'importance des JAOs dans le contrôle homéostatique des JAs dans les feuilles de Riz.

Afin de valider ces observations préliminaires faites dans les feuilles et étudier l'impact de chacune des enzymes JAOs sur le contrôle des niveaux de JAs nous avons décidé d'élargir cette analyse du profil

Shoot

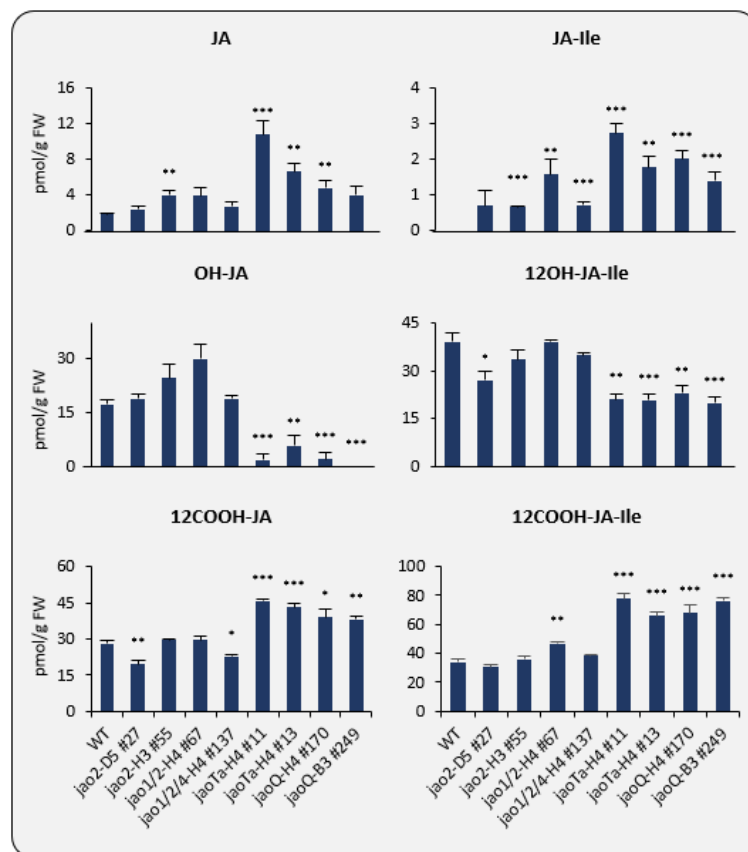


Figure II.18 : Analyse du profil des JAs dans les feuilles de plantes sauvages (WT) et des mutants *jao* de la génération T3.

Les feuilles utilisées ont été collectées séparément de plantules âgées de 9 jours. Les JAs ont par la suite été extraits des deux tissus puis quantifiés après analyse des extraits en LC-MS/MS. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM, exprimée en pmol g⁻¹ de poids frais (FW), de 5 répétitions biologiques. Les astérisques indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs de chaque mutant comparée à celles des WT (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

métabolique des JAs à tous les mutants simples et multiples générés (avec 5 réplicas au lieu de 3 précédemment), en utilisant 2 allèles différents disponibles pour chaque mutant en T3. Pour ce faire, l'analyse en LC-MS/MS a à nouveau été réalisée sur des extraits méthanoliques de feuilles de plantules de 9 jours pour doser les mêmes composés que sur l'analyse précédente. Le résultat confirme effectivement que l'inactivation des JAOs chez les différents mutants influence significativement le profil des JAs (Figure II.18). Chez les mutants d'ordre supérieur *jaoT-H4* #11, *jaoT-H4* #13, *jaoQ-H4* #170 et *jaoQ-B3* #249, on observe une absence presque totale de OH-JA, détectable uniquement dans certains réplicas. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation significative des niveaux de JA, de JA-Ile et de ses dérivés 12COOH-JA-Ile et 12COOH-JA. Toutefois, le 12OH-JA-Ile montre des niveaux plus faibles chez ces mutants que chez le WT. Ces informations suggèrent que l'inactivation de la voie JAO dans les feuilles de Riz crée une réorientation significative du pool de JA, normalement métabolisé en OH-JA par les JAOs chez le WT, vers la formation de l'hormone bioactive JA-Ile et de ses dérivés oxydés formés par des CYP94 (Hazman et al., 2019). Ce détournement de JA semble cependant s'opérer de façon conséquente que lorsque *OsJAO1*, *OsJAO2* et *OsJAO3*, les 3 *OsJAOs* exprimées dans les feuilles, sont simultanément inactivés. Chez les mutants *jao2-D5* #27, *jao2-H3* #55, *jao1/2-H4* #67 et *jao1/2/4-B3* #137, les niveaux de JA, tout comme ceux de OH-JA, sont similaires aux teneurs observées chez le WT. Néanmoins, on observe, chez ces mutants, une légère accumulation de JA-Ile, hormone active qu'on ne détecte d'ailleurs pas chez le WT. Ceci indique que l'inactivation partielle de la voie JAO crée également une réorientation du flux de JA vers le JA-Ile qui est légère puisque les niveaux de 12COOH-JA, 12COOH-Ile et 12OH-JA-Ile restent proches des quantités détectées chez le WT. Ces différences subtiles de profils montrent également l'importance de mesurer plusieurs composés, et notamment les catabolites, pour appréhender la complexité de l'impact des mutations *jao* sur l'homéostasie des JAs.

b. Impact sur la signalisation JAs

L'inactivation partielle ou totale de la voie JAO, chez les différents mutants analysés, entraîne une accumulation nette de JA-Ile susceptible d'activer la signalisation JAs. Il est établi que l'accumulation de JA-Ile stimule la liaison de son corécepteur COI (au nombre de trois chez le Riz) avec les répresseurs JAZ, ce qui entraîne la dégradation de ces derniers via le protéasome et la dérégulation de l'expression des gènes de réponse aux JAs (Wasternack and Hause, 2013). Chez les mutants *jao2* et *jaoQ* (*joxQ*) d'*Arabidopsis*, le flux augmenté de JA vers le JA-Ile active de façon constitutive la signalisation JAs qui se traduit par la surexpression de gènes de défenses JA-dépendants tels que *PDF1.2* et une meilleure résistance à des stress biotiques ou abiotique comme le stress hydrique (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Marquis et al., 2022). Il devient alors intéressant de déterminer si l'accumulation de JA-Ile observée chez les mutants *jao* de Riz est réellement accompagnée d'une activation de la signalisation JAs.

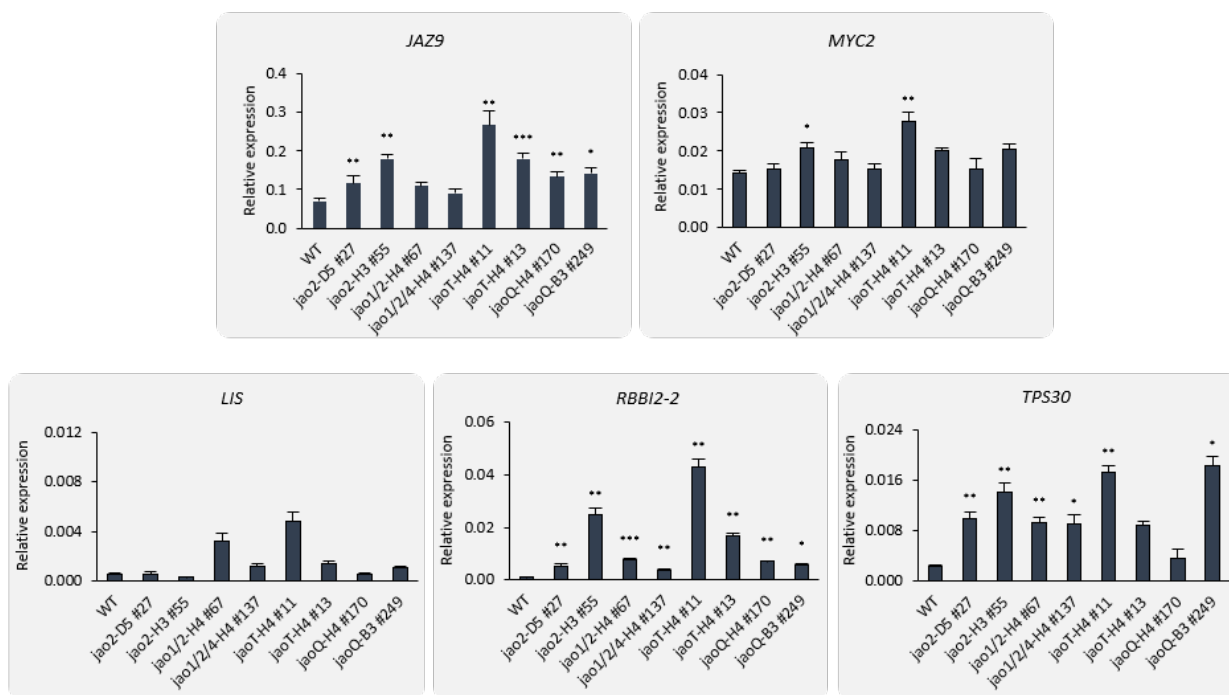


Figure II.19 : Analyse de l'expression de marqueurs de signalisation JAs (*JAZ9* et *MYC2*) et de marqueurs de défense JA-dépendants (*LIS*, *RBB12-2* et *TPS30*) dans les feuilles de plantes sauvages (WT) et des mutants *jao*. Les ARNs analysés ont été extraits des mêmes feuilles qui ont servi pour l'analyse du profil des JAs. Les ARNs ont été rétro-transcrits puis analysés en RT-qPCR pour déterminer l'expression relative des différents gènes cibles par rapport au niveau d'expression des gènes de références *UBQ5* et *UBQ10*. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de 4 répétitions biologiques. Les astérisques indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues (t-test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Pour ce faire, nous avons extrait des ARNs des mêmes échantillons de feuilles (mutants T3) utilisés pour le dosage des JAs et analysé en RT-qPCR l'expression de quelques gènes de réponses aux Jasmonates (Figure II.19). Ceux-ci ont été choisis parmi les gènes dont l'expression est significativement perdue en absence de JAs, révélé par la comparaison des transcriptomes de mutants *aoc* (déficient en JAs) et de plantes WT (chapitre III). Les gènes *JAZ9* et *MYC2* ont ainsi été analysés comme marqueurs de la signalisation JAs. Comme marqueurs de défense JA-dépendants nous avons analysé l'expression des gènes codant respectivement l'inhibiteur de protéase *RBB12-2* et la sesquiterpène synthase *TPS30*, proche orthologue de *ZmTPS10* dont les produits (E)- β -farnesene, (E)- α -bergamotène sont des phéromones qui seraient impliquées dans la défense indirecte contre les attaques d'herbivores chez le Maïs (Schnee et al., 2006). De plus, nous avons analysé l'expression du gène *LIS*, une cible des JAs activée par l'intermédiaire du facteur de transcription *RERJ1* (Valea et al., 2021). *LIS* code pour une linalool synthase impliquée dans la défense indirecte contre l'attaque d'insectes tels que *Spodoptera frugiperda* (Yuan et al., 2008).

JAZ9 présente une expression significativement plus élevée chez les mutants *jao2*, *jaoT* et *jaoQ* comparé au WT. Son niveau d'expression chez les mutants *jao1/2-H4* #67 et *jao1/2/4-B3* #249 est légèrement plus élevé que chez le WT, sans être statistiquement différent du WT. Cette induction de l'expression de *JAZ9* soutient alors que l'accumulation de JA-Ile, causée par la déficience des JAOs chez ces mutants *jaos*, active effectivement la signalisation JAs basale chez le Riz. Les niveaux d'expression du gène *MYC2* sont néanmoins très similaires chez le WT et les mutants *jao*, à l'exception de *jaoT-H4* #11 et *jao2-H3* #55 où son niveau d'expression est plus élevé. Cependant, la régulation de *MYC2* est notoirement connue pour s'exercer au niveau post-traductionnel plutôt que transcriptionnel. Quant aux marqueurs de défense, l'expression du gène *LIS* est très faiblement détectée dans nos extraits et les différences de niveaux d'expression observées ne sont pas significatives. Les deux autres marqueurs de défense *RBB12-2* et *TPS30* sont quant à eux bien détectés et globalement plus exprimés chez les mutants *jaos* que chez le WT. Cela résulte probablement de l'activation de la signalisation JAs chez les mutants *jaos* qui entrainerait l'induction sélective des réponses de défenses JA-dépendantes.

c. Impact des mutations *jao* sur le métabolisme : analyse métabolique non-ciblée

La signalisation JAs, lorsqu'elle est induite, exerce une forte influence sur le métabolisme des plantes (Nguyen et al., 2022), d'une part, par le biais de son interaction avec les autres voies hormonales dont certaines sont réprimées ou activées par les JAs selon le processus biologique concerné (Yang et al., 2019), et d'autres part, par le contrôle de l'expression d'un bon nombre de gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire (Wasternack and Hause, 2013). Cette régulation des gènes du métabolisme secondaire est par ailleurs une composante clé dans l'effectivité des réponses activées par les JAs après leur induction suite à des stress abiotiques ou biotiques chez différentes espèces de plantes

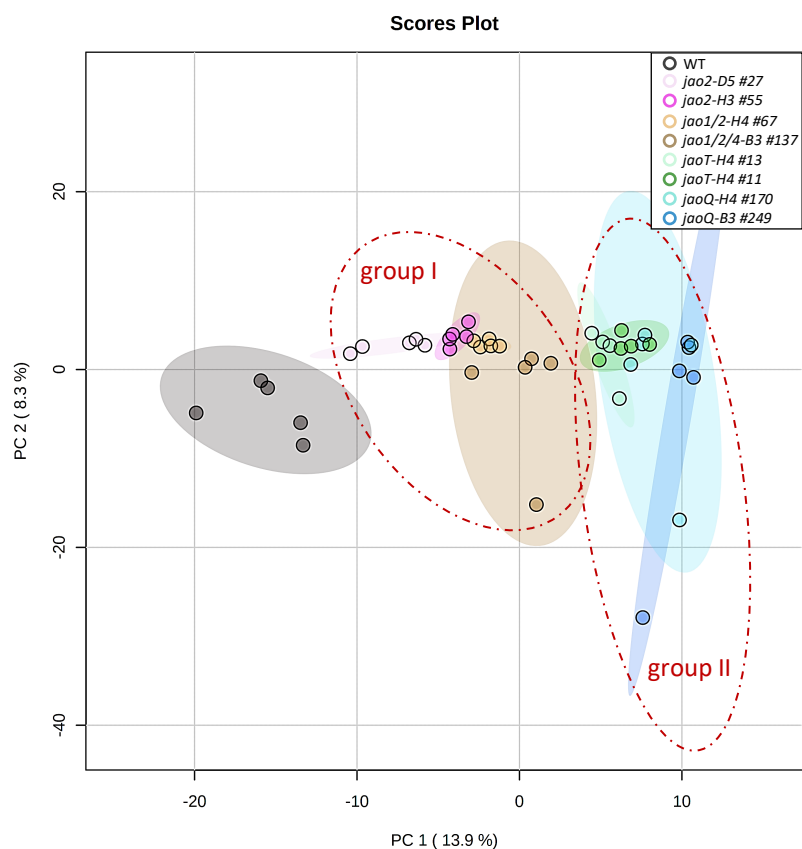


Figure II.20 : Analyse en composantes principales (ACP) de la distribution du métabolome des feuilles des plantes WT et des mutants *jaos*.

Chaque génotype est représenté par 5 répliques biologiques (excepté le mutant *jaoT-H4 #11* qui n'avait que 4 répliques) dont les extraits ont été soumis à une analyse métabolique non-ciblée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Le fond coloré marque les répliques de chaque génotype.

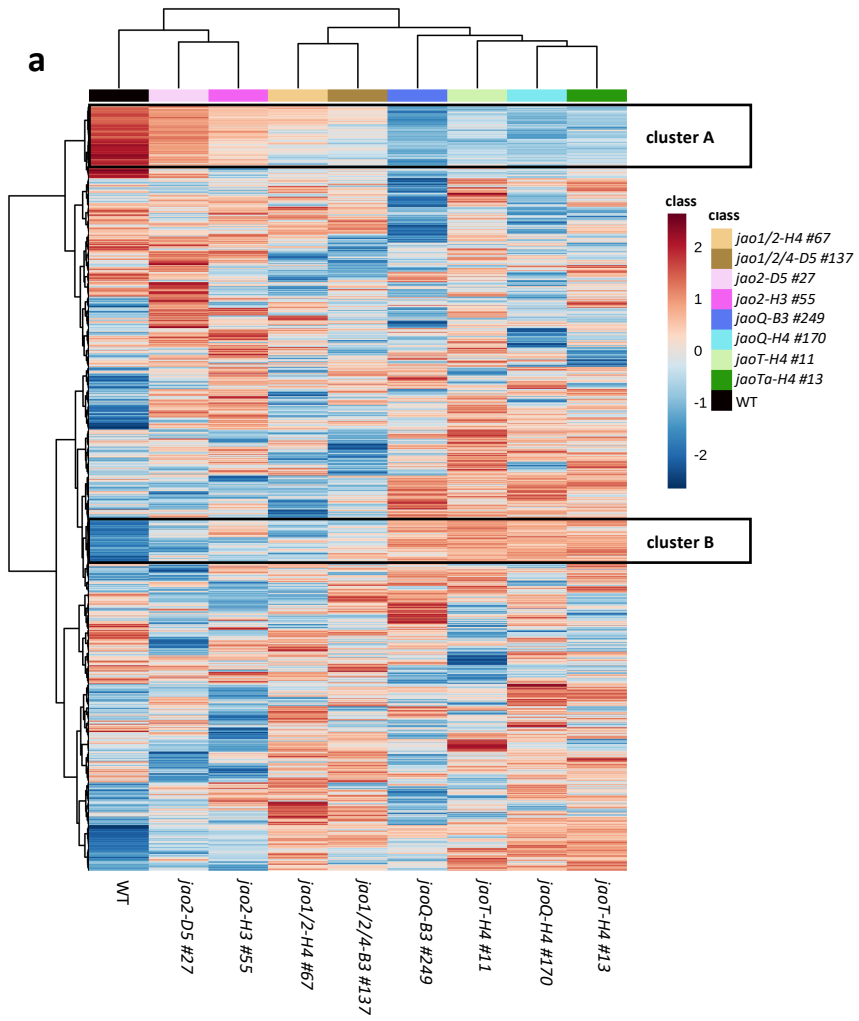
	Differential compounds compare to WT	
	down	up
jao2-D5 #27	94	68
jao2-H3 #55	137	88
jao1_2-H4 #67	136	94
jao1_2_4-B3 #137	129	64
jaoT-H4 #11	193	143
jaoT-H4 #13	182	137
jaoQ-H4 #170	197	131
jaoQ-B3 #249	214	128

Tableau II.3 : Représentation des nombres de composés différentiels entre le WT et chaque des mutants *jaos* parmi les 1849 composés identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS.

up : composés plus enrichis chez le mutant; down : composés moins enrichis chez le mutant ($-1 < \log_2 FC > 1$; $p\text{-value} < 0.1$).

(Campos et al., 2014). Par exemple, la biosynthèse chez le Riz de la phytoalexine sakuranétine en réponse au champignon *M. oryzae* est fortement dépendante de la signalisation JAs qui l'induit via l'activation de l'expression de *NOMT*, le gène codant l'enzyme de méthylation de la naringénine en sakuranétine (Riemann et al., 2013). Cette influence des JAs sur le métabolisme des plantes nous amène à la question de savoir si la fonction JAO chez le Riz, déterminée maintenant comme essentielle pour la répression de la signalisation JAs dans les feuilles non stimulées, permet également un contrôle du métabolisme. Pour ce faire, nous avons soumis les mêmes extraits méthanoliques utilisés pour le dosage des JAs dans les feuilles des mutants *jaos* (T3) et des plantes WT à une analyse métabolique non ciblée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), dans le but de comparer le métabolome des feuilles des différents génotypes.

Cette analyse a permis de détecter, dans l'ensemble des 44 échantillons (9 génotypes x 5 répétitions biologiques excepté le mutant *jaoT-H4 #11* qui n'avait que 4 répliques), 1849 composés dont de faibles proportions sont significativement différentiels entre les mutants et le WT (annexe II.1). Pourtant, ces quelques composés différentiels suffisent à créer des divergences nettes dans le métabolome global des feuilles des WT et celui des feuilles des mutants *jao*, comme l'illustre l'analyse en composante principale (Figure II.20). Il existe également des différences nettes entre les métabolomes de certains mutants *jaos* permettant ainsi de distinguer deux groupes au sein des mutants. Le groupe I est formé des mutants simples *jao2* et des mutants *jao1 2-H4 #67* et *jao1 2 4-B3 #137* dont les métabolomes semblent plus proches de celui des plantes WT. Le groupe II est constitué des mutants *jaoT* et *jaoQ* dont les métabolomes sont encore plus divergents de celui des plantes WT. La différence dans les métabolomes des *jaos* des groupes I et II se reflète davantage sur les nombres de composés différentiels (differential compounds DC ; Fold Change ≥ 2 ; p-value < 0.1) entre les mutants et le WT (Tableau II.2). Par exemple, le nombre de composés enrichis (DC-up) chez les mutants du groupe I est en moyenne 80 contre une moyenne de 130 composés enrichis chez les mutants *jaos* du sous-groupe II. Ces observations illustrent ainsi un effet cumulatif de l'inactivation des *JAO* sur le métabolome du Riz qui corrèle d'ailleurs avec les niveaux de JA-Ile qui, pour rappel, sont bien plus élevés lorsque les *JAO1*, *JAO2* et *JAO3*, les 3 isoformes exprimés dans les feuilles, sont simultanément inactivées chez les mutants *jaoT* et *jaoQ* du sous-groupe II. Cet effet cumulatif des mutations est bien mieux illustré par le profil d'accumulation de deux « clusters » (A et B) de composés dans les génotypes analysés (Figure II.21.a). Le **cluster A** contient des composés plus abondants chez les plantes WT et dont les niveaux diminuent graduellement avec l'inactivation séquentielle des *JAO1*, *JAO2* et *JAO3* respectivement chez les mutants simples *jao2*, le mutant double *jao1 2-H4 #67* et le mutant *jaoT* et *jaoQ*. A l'inverse, le **cluster B** contient des composés moins abondants chez les WT qui s'accumulent avec l'addition des mutations. Les composés ont été annotés après interrogation des banques de données KNApSACk, FoodDB, NPA, PhenolExplorer, PlantCyc, et d'une librairie spectrale interne. La relativement faible annotation (30% des composés annotés au moins une fois) des composés ne permet malheureusement pas d'identifier les molécules présentes dans ces deux



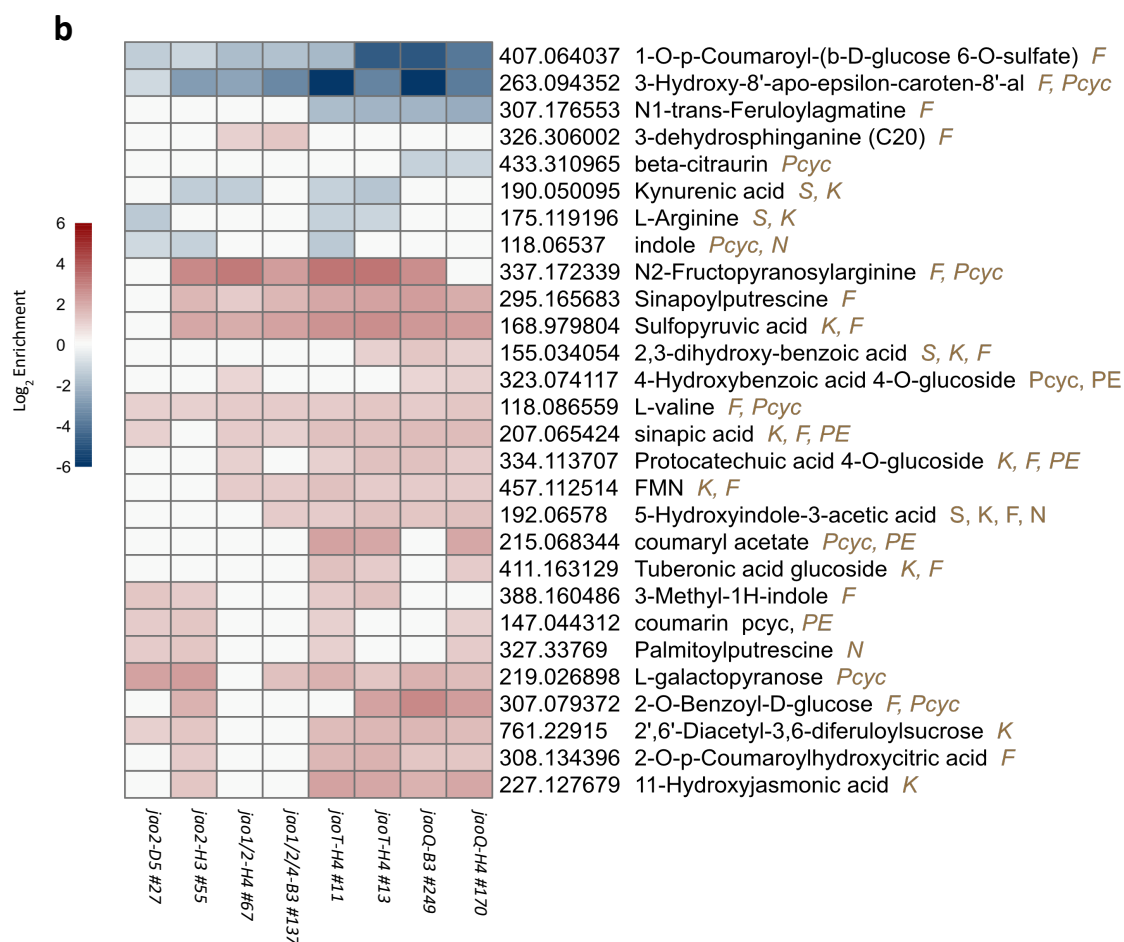


Figure II.21 : illustration de l'abondance des composés identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS sur les feuilles des plantes WT et des mutants *jao*.

a. Heatmap représentant l'abondance relative de tous les composés identifiés (~1848) valeur représenté **b.** Heatmap représentant l'enrichissement des composés annotés (parmi ceux identifiés) dans les feuilles des mutants *jao* par rapport au WT. Les bases de données interrogées K : KNApSAcK ; F : FoodDB ; PE : PhenolExplorer ; PC : PlantCyc ; N : NPA ; S : Une librairie spectrale interne(PIMS-IBMP). ($-1 < \log_2 FC > 1$; $p\text{-value} < 0.1$)

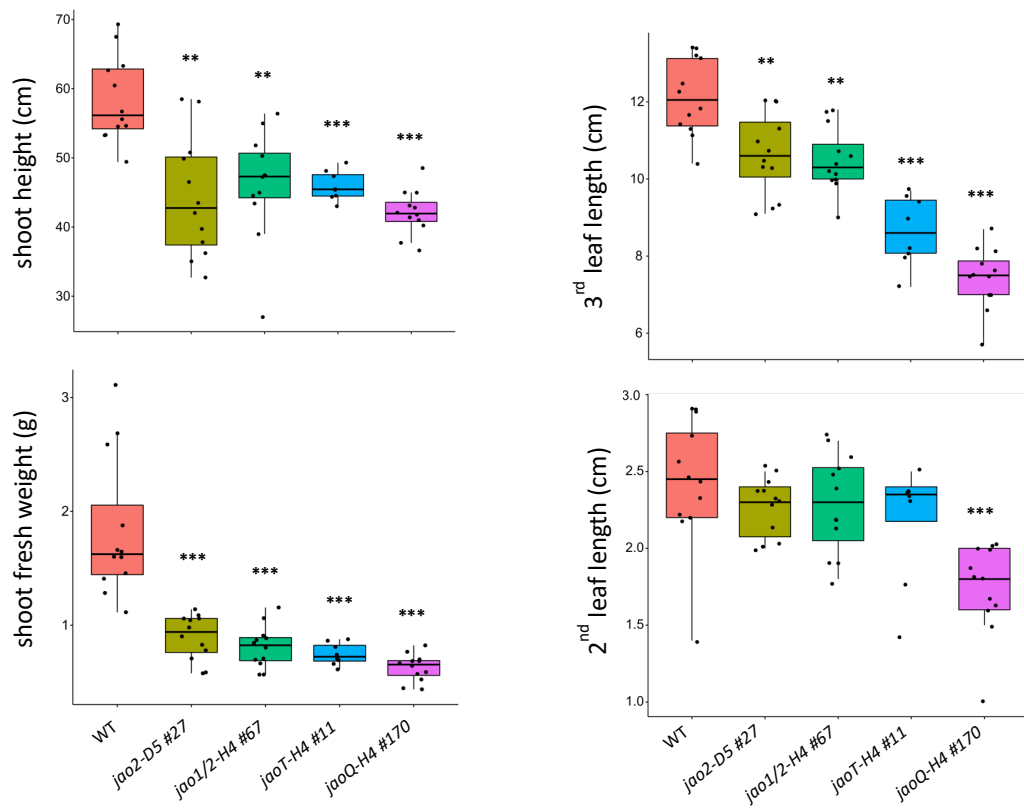
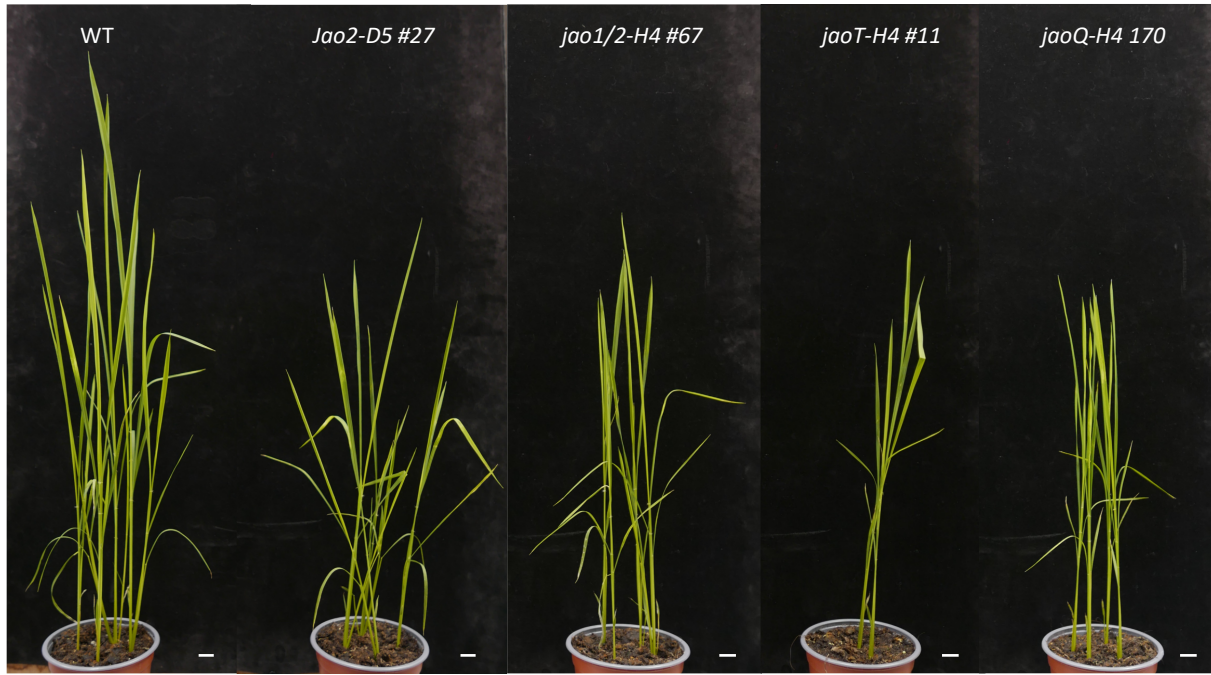


Figure II.22 : Comparaison du phénotype développemental de la partie aérienne des mutants *jaos* et de plantes WT âgés de 4 semaines.

Les différences entre les génotypes sont quantifiées en mesurant le poids frais, la hauteur et la longueur des feuilles 2 et 3 des plantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). La longueur de la barre d'échelle correspond à 2 cm de mesure réelle.

clusters, d'autant moins qu'il est fréquent que différentes banques indiquent des annotations discordantes pour un même composé. Une analyse fine des 560 composés annotés révèle 28 composés aux profils similaires à ceux des clusters A et B (Figure II.21.b). Parmi les molécules plus abondantes chez les mutants *jaos*, on compte la présence de sucres, de quelques composés phénoliques dont des coumarines (coumaryl acetate, coumarine) et la phénolamide sinapoylputrescine ainsi que la palmitoylputrescine, une molécule à propriété antibactérienne (Brady and Clardy, 2004). On note également, chez les mutants, l'accumulation d'un dérivé hydroxylé de l'acide salicylique (2,3-dihydroxy-benzoic acid) (Dempsey et al., 2011) et de deux composés annotés comme du 11-Hydroxyjasmonic acid (11-OH-JA), du « tuberonic acid glucoside » (12-O-Glc-JA) qui sont deux dérivés des JA (Miersch et al., 2008). En dehors des clusters A et B, des modifications d'abondance plus disparates semblent exister, ouvrant la possibilité de régulations plus complexes dans certains génotypes. Les modifications sur le métabolome des feuilles de Riz induites par l'altération de la voie JAO reflète donc l'influence manifeste de celle-ci sur la régulation par les JAs des processus biologiques qui régissent le métabolisme chez le Riz.

d. Impact sur le contrôle du développement

Hormis leur fonction d'activateur des réponses de défenses, les JAs sont également connus pour leur impact négatif sur le développement des plantes (Guo et al., 2018). Une fonction généralement mise en évidence par un traitement externe de JA sur les plantes (Noir et al., 2013; To et al., 2019). L'accumulation de JA-Ile observée chez les feuilles des mutants *jaos* et la signalisation JAs constitutive qu'elle engendre sont également susceptibles d'affecter le développement des mutants. Pour évaluer ce potentiel effet de la perturbation du métabolisme des JAs, nous avons analysé de plus près la croissance de la partie aérienne des mutants et de plantes WT.

Pour permettre une analyse efficace du phénotype de croissance, nous avons décidé de réduire le nombre de génotypes. Pour ce faire, les plantes WT ont été comparées seulement avec le mutant *jao1/2-H4* #67 et un seul allèle des mutants *jao2*, *jaoT* et *jaoQ*. Le choix de réduire les génotypes est d'autant plus motivé par le constat que, sur toutes les analyses moléculaires faites, les résultats obtenus pour les 2 allèles des mutants *jao2*, *jaoT* et *jaoQ* étaient toujours similaires (sauf TPS30). Ainsi, après quatre semaines de culture, on peut observer que les plantes déficientes en JAO présentent une biomasse nettement plus faible que le WT (Figure II.22). Cela est illustré par une hauteur et un poids frais réduits de la partie aérienne des mutants, comparé au WT. Les mutants *jaos* présentent donc une croissance réduite qui se reflète également sur la longueur du limbe des feuilles 2 et 3. Ces feuilles 2 et 3 sont les seules à être comparées puisqu'elles sont, avec la feuille 1 (sénescence), les seules ayant atteint la maturité complète à ce stade du développement. Les feuilles 2 des mutants *jao2-D5* #27, *jao1/2-H4* #67 et *jaoT-H4* #11 sont de tailles similaires à celles des WT alors que celles des mutants *jaoQ-B3* #249 sont nettement plus petites. Quant aux feuilles 3, nettement plus longues que les feuilles 2, elles sont également plus petites chez *jaoQ-B3*

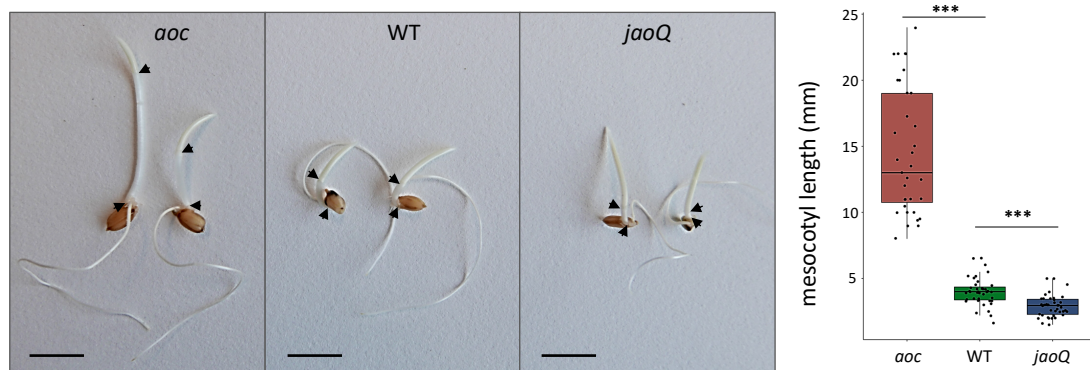


Figure II.23 : Comparaison de l'élongation du mésocotyle de plantules de Riz WT, *aoc* et *jaoQ* après 4 jours de germination des graines à l'obscurité.

Pour chacun des trois génotypes, les boîtes à moustaches représentent les mesures de la longueur du mésocotyle de 35 plantules. Les astérisques indiquent une différence significative entre les mesures du mésocotyle des mutants et celles des plantules sauvages (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). Les deux flèches noires représentées sur les plantules marquent les limites de leur mésocotyle. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

#249, suivies par celles des mutant *jaoT-H4* #11. Les feuilles 3 des mutants *jao2-D5* #27 et *jao1/2-H4* #67, de tailles quasi similaires, sont plus grandes que celles des mutants *jaoT-H4* #11 mais plus petites que celles des plantes WT. On observe ici une diminution de la taille des feuilles 3 avec l'incrémentation des *OsJAOs* inactivées. Ceci semble également se refléter sur le port des plantes avec les mutants triple et quadruple ko, à feuilles plus courtes, ayant un port plus droit que les autres génotypes.

5. Les mutations *jaoQ* et *aoc* induisent des phénotypes antagonistes

La croissance réduite des mutants *jao*, certainement causée par la suraccumulation de JA-Ile et l'activation conséquente de la signalisation JAs, est cohérente avec la croissance excessive des feuilles des mutants *aoc* occasionnée par la déficience en hormone et en signalisation JA-Ile. Ces phénotypes opposés matérialisent la forte implication des JAs dans la régulation de la croissance chez les plantes. La comparaison du phénotype de développement ou de réponse à des stress du mutant *aoc* avec celui de plantes sauvages de Riz a également permis de révéler d'autres processus biologiques étroitement régulés par la signalisation JAs. Par exemple, La croissance très différente du mésocotyle et du coléoptile de plantules *aoc* et WT en réponses à une baisse de la qualité de lumière a permis de mettre en évidence l'importance des JAs dans la photomorphogenèse (Svyatyna et al., 2014). Les mutants *aoc* présentent en effet un mésocotyle très long lorsque leurs graines sont germées à l'obscurité (Riemann et al., 2003). C'est d'ailleurs principalement sur la base de ce phénotype que les individus homozygotes *aoc* sont isolés parmi la descendance des mutants hétérozygotes *aoc/AOC*, puisque les mutants homozygotes *aoc/aoc* sont mâle stériles. Outre son effet sur la photomorphogenèse et la fertilité des plantes de Riz, la déficience en JAs des mutants *aoc* est particulièrement associée à une sensibilité plus forte au champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* (Riemann et al., 2013) mais également à la déprivation d'eau (Tang et al., 2020a; Dhakarey et al., 2016). Nous nous sommes alors intéressés de savoir si, à l'instar de la croissance aérienne, le surplus de JA-Ile chez les mutants *jao* pourrait induire des phénotypes antagonistes à ceux induits par la déficience en JAs des mutants *aoc*. Pour ce faire, nous avons mis en place différentes expériences pour comparer le développement et la réponse aux stress de plantes sauvages (WT) et des mutants *aoc* et *jaoQ* (*jaoQ-B3* #249).

a. La mutation *jaoQ* accentue l'inhibition de croissance du mésocotyle à l'obscurité

Les graines de plantes *jaoQ*, *aoc* et WT ont été mises à germer à l'obscurité pour évaluer l'élongation du mésocotyle sur les plantules des trois génotypes. Après 4 jours de germination, les mutants *aoc* présentaient, comme décrit par Riemann et al. (2003), un mésocotyle nettement plus long que les plantules WT avec une différence de l'ordre 10 mm (Figure II.23). A l'opposé, les plantules *jaoQ* présentaient un mésocotyle plus petit que celui des plantules WT. La différence de longueur des mésocotyle des plantules WT et *jaoQ*, de l'ordre de 1 mm, est toutefois moins prononcée que celles entre les plantules *aoc* et WT.

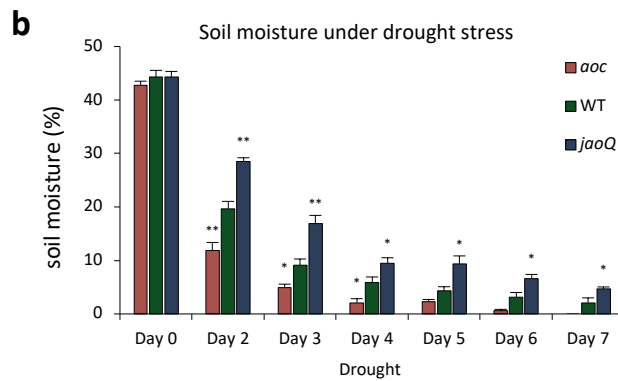
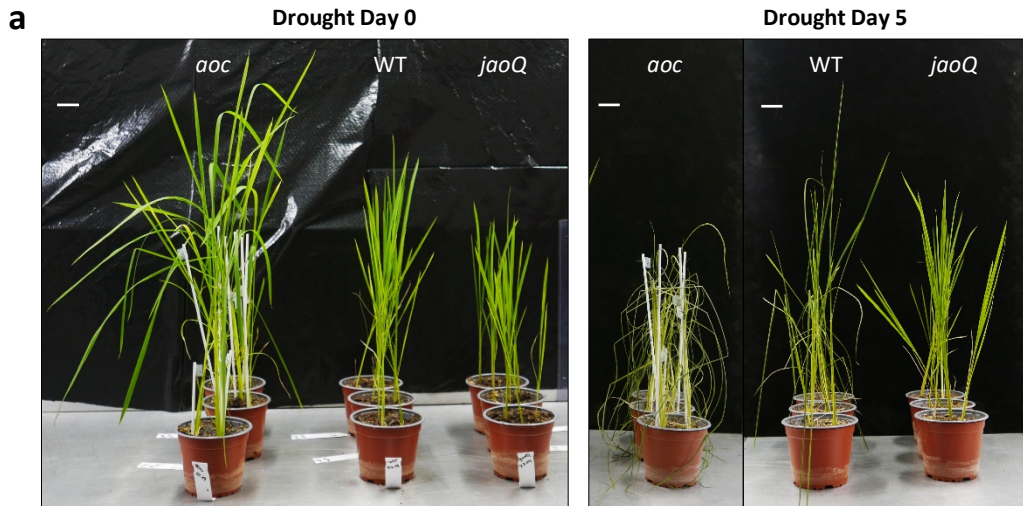


Figure II.24 : Comparaison de la sensibilité des plantes sauvages (WT) et des mutants *aoc* et *jaoQ*(-B3 #249) à la sécheresse.

a. Phénotypes des plantes des 3 génotypes privées d'eau pendant 5 jours après 4 semaines de culture en hydratation maximale sur des plateaux remplis d'eau. b. Mesures de l'humidité du sol du dernier jour d'arrosage jusqu'au septième de privation d'eau. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM de 4 mesures faites le même jour sur différents pots. Les astérisques indiquent une différence significative entre les mesures des pots des plantes des mutants et celles des pots des plantes sauvages (t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). La longueur de la barre d'échelle correspond à 5 cm de mesure réelle.

b. Les mutants *jaoQ*, moins sensibles à la déprivation d'eau que les plantes *aoc* et WT

L'impact positif de la signalisation JA sur la tolérance à la sécheresse est maintenant mieux documenté (Kim et al., 2017; Mahmud et al., 2022; Marquis et al., 2022). Les différences de sensibilité des plantes *jaoQ*, *aoc* et WT à la déprivation d'eau ont donc été comparées. Pour ce faire, les plantes des trois génotypes ont été mises en culture sur des pots de terre avec un poids constant, puis placées sur des plateaux remplis d'eau pour assurer une hydratation maximale du terreau (40% d'humidité - Figure II.24). Après 4 semaines de culture, les mutants *aoc* présentaient une biomasse aérienne apparente nettement plus importante que les plantes WT, ces dernières présentant, comme démontré précédemment (Figure II.22), une biomasse apparente plus importante que les mutants *jaoQ* (Figure II.24). Toutes les plantes ont par la suite été transférées sur des plateaux dépourvus d'eau puis, leur phénotype et l'humidité de la terre suivis sur sept jours. Dès le 2^{ème} jour de privation d'eau, on observait une baisse significative de la teneur en eau dans les pots de culture des plantes, plus importante dans les pots des mutants *aoc* et moins importante dans les pots des mutants *jaoQ*. La même tendance est observée du jour 3 de privation d'eau jusqu'au jour 7, où les pots des mutants *aoc* étaient quasiment secs. Sur le plan phénotypique, le flétrissement des feuilles induit par le manque d'eau touchait pratiquement toutes les feuilles des mutants *aoc*, dès 4 jours de privation d'eau alors que les feuilles des plantes WT et *jaoQ* étaient globalement inaffectées (donnée non illustrée). Au quatrième jour, les symptômes de privation d'eau étaient encore plus sévères chez *aoc* et commençaient à apparaître sur les plantes WT. Pendant ce temps, les feuilles des mutants *jaoQ* restaient inaffectées malgré la baisse de la teneur en eau dans la terre. Cette tendance s'est poursuivie jusqu'au jour 7 de privation d'eau où les plantes *aoc* et WT étaient toutes sèches alors que les mutants *jaoQ* commençaient à montrer des symptômes de sécheresse.

Ces observations indiquent ainsi que lorsque ces trois génotypes sont soumis à la déprivation d'eau, le mutant déficient en JAs est plus sévèrement affecté et plus tôt, suivi du WT puis du mutant *jaoQ*. La précocité et la sévérité des symptômes chez le mutant *aoc* et le sauvage s'expliqueraient - en partie - par une consommation plus importante d'eau des plantes *aoc* et WT, à forte biomasse, comme l'illustre la réduction rapide de la teneur en eau de leur pot de culture (Figure II.24.b). Il reste cependant à déterminer si cette consommation forte en eau résulte d'une perte incontrôlée d'eau par les stomates chez le mutant *aoc* et à moindre échelle chez le WT. La tentative de mesure de la conductance stomatale des feuilles n'a pas abouti à cause de la largeur des feuilles de Riz trop fine pour le poromètre utilisé (« SC-1 stomatal conductance porometer » de « METER Group »). Une alternative au stress hydrique soumis par un arrêt de l'arrosage serait une exposition aux plantes cultivées en hydroponie à une solution de « PEG 6000 ». Elle permettrait de s'assurer que les plantes des 3 génotypes, malgré les différences de biomasse, soient soumises, simultanément, aux mêmes conditions de stress hydrique et de comparer leur capacité de rétention d'eau dans les feuilles. Dans ces conditions, Gangliang et al. (2020a) ont démontré récemment que la déficience en JAs du mutant *aoc* augmente la sensibilité du Riz au stress hydrique. Des observations

très cohérentes avec les symptômes précoces du mutant *aoc* dans notre expérience de stress hydrique (Figure II.24).

c. La résistance à *M. Oryzae* et la fertilité du mutant *jaoQ* en cours de test.

Nous avons initié plus récemment à l'IRD de Montpellier, avec nos collaborateurs sur place, différentes expériences qui visent à comparer la fertilité des mutants *jaoQ* avec celle des plantes WT mais également leur sensibilité au champignon pathogène de Riz *Magnaporthe oryzae* pour lequel la tolérance est dépendante de la signalisation JA (Riemann et al., 2013). Ces expériences n'ont malheureusement pas pu être réalisées à l'IBMP puisque nous ne disposons ni des infrastructures ni de l'expertise permettant de les faire.

C. Discussion

1. Le Riz possède une voie JAO fonctionnelle

L'inactivation du JA-Ile par oxydation (par les CYP94B4/B5/C2b) ou par déconjugaison de l'acide aminé isoleucine (par AH8) étaient les seuls mécanismes de catabolisme des Jasmonates qui étaient partiellement connus à ce jour chez le Riz et qui permettent le contrôle des niveaux des JA-Ile après sa formation (Hazman et al., 2019). Dans cette étude, nous avons exploré l'existence, chez le Riz, d'une voie d'oxydation directe du JA, un autre mécanisme de catabolisme des JAs identifié récemment chez *A. thaliana* et *N. attenuata* (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b), qui contribue au détournement des flux de JA en amont de la formation de JA-Ile. En utilisant la séquence protéique de la protéine AtJAO2 d'Arabidopsis et sur la base des propriétés structurales définies pour les enzymes JAOs (Zhang et al., 2021), j'ai pu identifier, dans le génome du Riz, 4 gènes codant pour des enzymes « JA Oxydase » actives nommées JAO1, JAO2, JAO3, JAO4 sur la base de leur proximité avec la protéine AtJAO2 (Figure II.5, II.6). Contrairement aux enzymes JAO1, JAO2, JAO3, un doute a subsisté sur la fonction JA Oxydase de la protéine JAO4, du fait d'abord de la présence d'une Thréonine à la place de la Sérine canonique décrite comme essentielle pour la liaison du cosubstrat 2-OG des 2-ODDs. De plus, le produit OH-JA des enzymes JAOs n'avait pas pu être détecté lorsque l'activité JAO4 avait été testée *in vitro*, justifiant d'ailleurs le test de l'activité JAO de sa variante synthétique JAO4:p.308T>S qui s'est elle aussi révélée inactive *in vitro* (Figure II.8). Cependant, une fonction JAO avérée de la protéine JAO4 et de sa variante JAO4:p.308T>S a pu être confirmée, grâce leur surexpression *in planta* chez le mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis pour compléter, à l'instar des JAO1, JAO2 et JAO3 de Riz, la déficience de la protéine AtAO2, dans sa fonction régulatrice (Figure II.9). Le génome de Riz code donc pour 4 enzymes JAOs actives (JAO1, JAO2, JAO3 et JAO4) tout comme Arabidopsis et le Tabac, les premières espèces chez qui l'existence de cette voie JAO avaient été démontrée (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b).

2. L'inactivation des JAOs modifie l'homéostasie des JAs dans les feuilles de Riz non stimulées

L'expression des gènes codant ces enzymes JAOs a également pu être examinée chez le Riz. Le gène *JAO4* n'est exprimé que dans les racines suggérant une fonction exclusivement racinaire pour cette isoforme. *JAO1*, *JAO2* et *JAO3* sont, quant eux, exprimés dans les racines et les feuilles et semblent donc contribuer au catabolisme du JA dans les deux organes. Ceci est par ailleurs soutenu par le fait que leur expression dans les feuilles de Riz est fortement dépendante de la présence des JA (Figure II.11), une propriété commune aux gènes de catabolisme des JAs (Koo et al., 2011; Widemann et al., 2013; Heitz et al., 2012; Hazman et al., 2019). Des outils supplémentaires, comme des lignées rapportrices GUS, pour chaque gène JAO seraient nécessaires pour visualiser les sites d'expression des JAO à l'échelle de la plante entière, par exemple à des stades plus tardifs de développement, ou en réponse à divers stimuli.

Globalement, cette voie JAO chez le Riz semble n'avoir une influence majeure que sur le métabolisme des JAs dans les feuilles en absence de stress. Son inactivation complète, chez les mutants *jaoQ*, n'induit aucune modification significative sur le profil des JAs dans les racines (tableau II.1) alors que dans les feuilles, elle induit une augmentation claire du flux de JA vers la formation de JA-Ile et de ses dérivés, qui s'accumulent fortement chez les mutants *jaoQ* et *jaoT* (figure II.18). L'absence quasi-totale de OH-JA chez ces derniers mutants et l'augmentation concomitante du JA est une autre illustration, bien plus nette, de la fonction JA Oxidase des enzymes JAOs *in planta*. Cependant, cette absence de OH-JA chez les mutants *jaoQ* malgré la présence de 12OH-JA-Ile, l'autre substrat de l'amido-hydrolase AH8 (Hazman et al., 2019), remet en question l'implication de AH8 dans la synthèse de 12OH-JA dans ces feuilles de Riz non stimulées. Cette observation est compatible avec deux hypothèses. La première soutiendrait une contribution très mineure, voire nulle, de AH8 dans la synthèse de 12OH-JA dans les feuilles de Riz non stimulées. Cela est néanmoins en contradiction avec la baisse du niveau de 12OH-JA-Ile chez les mutants *jaoT* et *jaoQ* malgré une augmentation de ces dérivés 12COOH-JA-Ile et 12COOH-JA (Figure II.19). L'autre hypothèse, plus probable, serait que le produit 12OH-JA de AH8 soit difficilement détectable dans les feuilles de Riz du fait de son métabolisme rapide en ces dérivés sulfatés ou glucosylés. Cela serait cohérent avec l'accumulation significative du composé annoté « tuberonic acid glucoside » (12-O-Glc-JA) chez les mutants *jaoT* et *jaoQ* (Figure II.21). Il serait alors intéressant de quantifier, de manière ciblée, les dérivés glucosylés et sulfatés du OH-JA chez les mutants *jaoQ* pour resituer l'implication de AH8 dans le catabolisme des JAs dans les feuilles de Riz. En attendant d'explorer ces alternatives, cette accumulation forte du JA-Ile et de ces dérivés dans les feuilles causée par l'inactivation de la voie JAO démontre l'importance que revêt également ce mécanisme de détournement du JA chez le Riz.

3. L'inactivation incrémentale des JAOs induit des variations transcriptionnels et métaboliques

La modification de l'homéostasie des JAs qu'occasionne l'inactivation des JAOs est synonyme d'une signalisation JAs constitutive dans les feuilles d'*Arabidopsis* et du Tabac, manifestée par la surexpression de gènes de défenses JA-dépendants et l'accumulation de métabolites de défenses. Chez le Riz, l'induction de l'expression de *JAZ9* dans les feuilles des mutants *jaos* non stimulées illustre également la mise en place d'une signalisation JAs augmentée chez ces derniers. La fonction de la voie JAO chez le Riz apparaît de ce fait très similaire à celle décrite chez *A. thaliana* et *N. attenuata* qui consiste à détourner le flux de JAs de la formation de JA-Ile pour maintenir une signalisation JAs résiduelle lorsque la plante ne perçoit aucun stimulus. Elle contribue ainsi à prévenir le coût énergétique que peuvent engendrer les réponses JA-dépendantes (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017; Tang et al., 2020b). Cette signalisation JAs constitutive observée chez les mutants *osjaos* exerce par ailleurs une influence mesurable sur les réponses de défense, révélée par la surexpression des marqueurs de défense *RBB12-2* et *TPS30*. Cette influence semble toutefois n'affecter qu'une partie des réponses de défense régulées par les JAs. L'expression des marqueurs de défense JA-dépendants *LIS* et *NOMT*, codant respectivement pour les enzymes de biosynthèse du linalool et de la phytoalexine sakuranétine (Shimizu et al., 2012; Valea et al., 2021), reste très similaire dans les feuilles des plantes WT et *jaos* lorsqu'elle est détectée (Figure II.19). Une analyse de transcriptome de type RNAseq serait bien plus pertinente pour révéler l'influence globale de l'altération de la voie JAO sur les cibles des JAs.

L'analyse métabolomique non ciblée a également révélé des divergences nettes entre le métabolome des feuilles des mutants *jaos* avec celui des feuilles WT. Des divergences qui, d'ailleurs, augmentent avec l'incrémental des mutations et fortement proportionnelles aux niveaux de JA-Ile dans les feuilles de plantes. L'accumulation modérée de JA-Ile chez les mutants *jao2*, *jao1/2* et *jao1/2/4* induit une influence sur le métabolome moins importante que l'accumulation plus forte de JA-Ile chez les mutants *jaoT* et *jaoQ*. Cet effet cumulatif des mutations est notamment illustré par la réduction et l'augmentation progressive respectivement, des composés des clusters A et B. Ces observations confirment les fonctions régulatrices des JAO sur de larges secteurs métaboliques chez le Riz. Cependant, contrairement au mutant *atjao2* d'*Arabidopsis*, qui accumule de nombreux composés de défense de type glucosinolates et phénolamides ainsi que des anthocyanes (Marquis et al., 2022), peu de métabolites à fonctions défensives démontrées ont été identifiés dans les extraits de Riz. Il est possible que ceux-ci soient moins représentés dans les banques de données utilisées. Parmi les composés annotés, on note particulièrement la suraccumulation, chez les mutants *jaos*, de la phénolamide sinapoylputrescine et la molécule antibactérienne palmitoylputrescine qui pourrait avoir une conséquence bénéfique dans la résistance de ces plantes à des pathogènes. Pour mieux exploiter ces données métaboliques, il est envisageable de les

retraiter avec une approche plus systématique, de type GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>) basée sur les spectres de masse d'un plus grand nombre de composés. Une telle analyse est à l'étude.

4. Une hiérarchie des JAOs pour l'atténuation de la signalisation JA chez le Riz ?

Il a également été démontré que la fonction répressive de la voie JAO sur la signalisation JAs dans les feuilles non stimulées d'*Arabidopsis* repose essentiellement sur l'activité de AtJAO2, l'isoforme le plus exprimé dans les feuilles (Smirnova et al., 2017). L'inactivation de AtJAO2 induit une signalisation JAs suffisamment forte pour réduire la sensibilité des mutants *atjao2* au pathogène fongique *Botrytis cinerea* (Smirnova et al., 2017) et au stress hydrique (Marquis et al., 2022). Chez le Riz, il est cependant plus difficile de définir une hiérarchie dans l'implication des différentes enzymes sur la fonction JAO. Dans les feuilles, OsJAO1, OsJAO2 et OsJAO3 semblent impliquées puisque OsJAO4 n'y est pas exprimée. De plus, l'absence simultanée de OsJAO1, OsJAO2 et OsJAO3 supprime la production de OH-JA chez les mutants triples *jaoT* qui présentent d'ailleurs des profils de JAs et des métabolomes très similaires à celui des quadruple mutants *jaoQ* (Figures II.18, II.20). Il est donc possible que JAO1, JAO2, JAO3 contribuent de façon redondante à la répression de la signalisation JAs dans les feuilles. L'activation de la signalisation JAs et la réduction de la biomasse aérienne observées déjà chez les mutants simples *jao2* témoignent de l'importance de JAO2 dans le catabolisme de JA dans les feuilles (Figures II.19, II.22). L'inactivation supplémentaire de JAO1 chez les mutants *jao1 2-H4 #67* et *jao1 2 4-B3 #137* ne semble occasionner aucun effet additif sur les phénotypes déjà causés par l'absence de OsJAO2. Il est toutefois difficile de conclure sur l'importance de JAO1 sur la base de ces observations qui révèlent plutôt la capacité de OsJAO3, à elle seule, à maintenir la fonction JAO. OsJAO2 et OsJAO3, les isoformes les mieux exprimés dans les feuilles (Figure II.11), semblent donc être capitales pour un fonctionnement adéquat de la voie JAO dans les feuilles de Riz. Le matériel génétique disponible n'est malheureusement pas suffisant pour définir en détails l'importance individuelle de chacune des OsJAO chez le Riz. Il serait intéressant de disposer, en plus, de mutants simples *jao1* et *jao3* afin de déterminer l'impact de l'inactivation singulière de OsJAO1 et OsJAO3 mais aussi de mutants doubles *jao2/3* pour déterminer si l'inactivation des JAOs à forte expression suffirait à elle seule à supprimer la production de OH-JA.

5. La voie JAO, un levier de régulation de la croissance et des réponses JAs dépendantes

Il est connu que la signalisation JA provoque une réduction de croissance chez les plantes (Wasternack and Hause, 2013; Guo et al., 2018), nécessitant son contrôle très strict pour optimiser la croissance au gré des stress environnementaux rencontrés. En mesurant plusieurs paramètres morphologiques chez les plantules, nous avons quantifié une inhibition progressivement plus forte chez les mutants multiples (Figure II.22), ce qui montre que l'activité JAO est nécessaire pour maximiser la croissance en conditions

optimales. Un phénomène similaire est également décrit pour le mutant *joxQ* d'Arabidopsis, qui présente une rosette plus petite que le WT (Caarls et al., 2017). Pour le moment, on ne saurait dire si cette réduction de la croissance de la partie aérienne chez ces espèces est due à une baisse de la multiplication cellulaire ou à la réduction de l'élongation. Marquis et al. (2020) avait toutefois démontré que les racines plus courtes des mutants *atjao4* d'Arabidopsis sont dues à une réduction de l'élongation des cellules des racines. Il faudrait donc comparer le nombre et la longueur des cellules des feuilles des mutants *jaos* et des plantes de Riz sauvage pour définir la réelle explication à leur différence de taille. De même, il sera important de suivre ces paramètres de croissance à des stades de développement plus avancés, jusqu'au stade reproductif. La croissance réduite et la perturbation du métabolisme observées chez les mutants *jaos* sont une illustration claire de l'importance du maintien, par la voie JAO, d'une signalisation JAs minimale en absence de stress pour réprimer les réponses JA-dépendantes.

Au-delà de son impact sur le développement, la fonction JAO chez le Riz posséderait également un fort potentiel de régulation des réponses biologiques dans lesquelles les JAs sont impliqués. Cela a été particulièrement mis en évidence pour la photomorphogenèse (Figure II.23) et la réponse du Riz au stress hydrique (Figure II.24) et au stress salin (Chapitre III, Figure III.10). Dans ces conditions, lorsqu'on compare les phénotypes des plantes WT, *jaoQ* et *aoc*, on remarque que le surplus de JAs des mutants *jaoQ* conduit à des phénotypes opposés à ceux occasionnés par la déficience en JAs des mutants *aoc*. Par exemple, la meilleure tolérance au stress hydrique de la plante sauvage de Riz par rapport au mutant *aoc*, soutenue par deux publications de nos collaborateurs allemands du KIT (Tang et al., 2020a; Dhakarey et al., 2017), est fortement améliorée chez *jaoQ*. La signalisation JAs constitutive occasionnée par l'inactivation de la voie JAO serait donc bénéfique pour la tolérance au stress hydrique chez le Riz comme cela avait été rapporté au laboratoire pour Arabidopsis (Marquis et al., 2022). Le rôle bénéfique des JAs dans l'amélioration de la tolérance au stress hydrique est par ailleurs rapportée chez plusieurs espèces dans des travaux utilisant très souvent un traitement MeJA/JA pour activer la signalisation JAs (Ndiaye et al., 2022; Yang et al., 2021; Wang et al., 2021a; Mohamed and Latif, 2017). On pourrait alors considérer le surplus de JA-Ile et la signalisation qu'elle induit chez les mutants *jaos*, comme une alternative plus constante et moins sévère au traitement externe de JAs, souvent utilisé dans l'étude des fonctions des JAs. En ce sens, les mutants simples *jao2* et les mutants quadruple *jaoQ* seraient donc deux outils de génétique avec des degrés différents d'activation de la signalisation JAs. Dans cette optique, nous avons déjà mis en place des expériences de pathotest pour comparer la sensibilité des plantes *aoc*, *jao2*, *jaoQ* et WT au champignon pathogène de Riz *Magnaporthe oryzae*. De plus, puisque la valeur économique du Riz dépend en priorité du rendement et de la qualité des grains, il est prévu d'évaluer les paramètres reproductifs et de mise à graine chez les lignées *jaos*, pour connaître les conséquences de la signalisation JA modifiée sur ces caractéristiques agronomiques.

6. Aspects évolutifs de l'apparition de la voie JAO

Le Riz est donc la troisième espèce de plantes après *Arabidopsis* et le Tabac, mais aussi la première céréale chez laquelle l'importance de cette voie de catabolisme JAO a été révélée. Elle ne semble toutefois pas restreintes à ces 3 espèces puisque des séquences orthologues des enzymes JAO sont retrouvées chez différents Angiospermes. Aucun orthologue des JAO n'est cependant trouvé chez la lycophyte *Selaginella moellendorffii* et les bryophytes *Physcomitrium patens* et *Marchantia polymorpha* (Figure II.5). La fonction JA Oxydase serait donc exclusivement conservée chez les plantes à graines. Cette notion avait d'ailleurs été avancée, quelques années plus tôt, par Kawai et al., (2014). Ces auteurs décrivaient le sous-groupe DOXC46 des 2-ODDs composé des JAO d'*Arabidopsis*, des JAOs de Riz nouvellement décrites, et de 2-ODDs non caractérisées de *Picea abies* (l'épicéa commun) comme un clade de 2-ODDs présent exclusivement chez les plantes à graines. L'absence de JAO chez les bryophytes est peu surprenante puisque le substrat JA n'est détecté qu'à partir des Trachéophytes dont *S. moellendorffii* (Stumpe et al., 2010; Yamamoto et al., 2015; Pratiwi et al., 2017). De ce fait, la présence exclusive des JAOs chez les plantes à graines stipule que la mise en place de ce mécanisme de catabolisme du JA par oxydation, intervenue vraisemblablement chez l'ancêtre commun des plantes à graines, serait postérieure à celle de la biosynthèse de JA apparue plus tôt chez l'ancêtre commun des Trachéophytes.

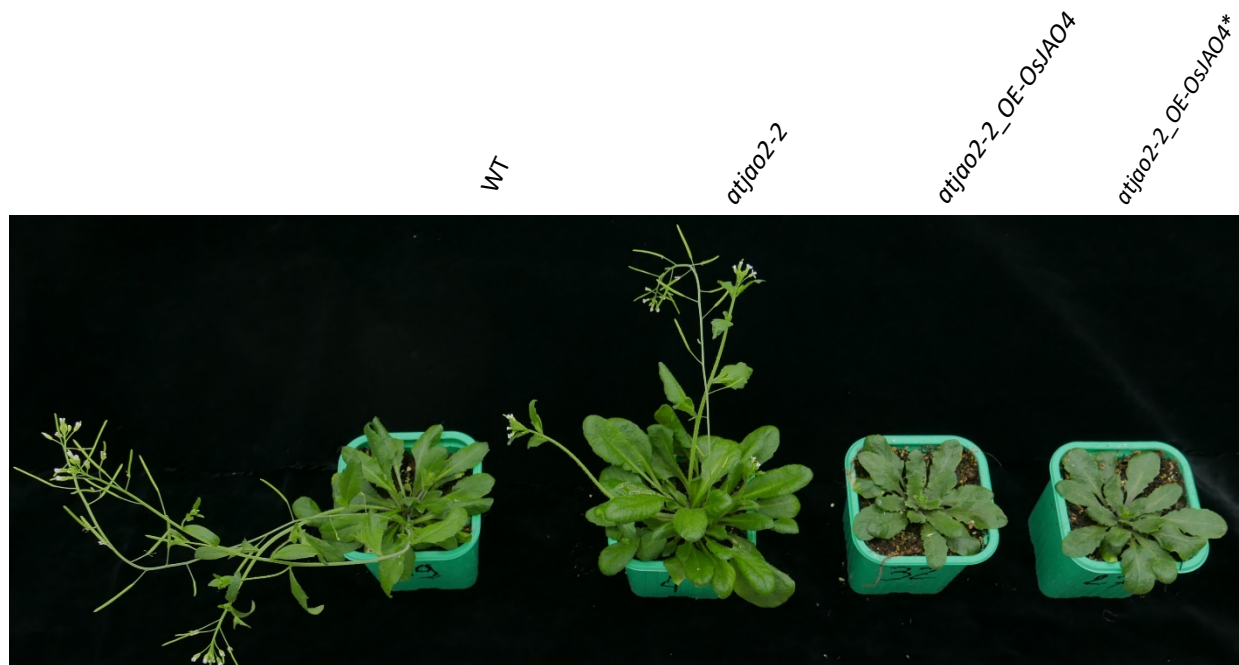
Chez *S. moellendorffii*, il existe une protéine prédite sm79989 proche des JAOs et des enzymes ANS et FLS (Figure II.5). D'une part, l'absence de la plupart des résidus requis pour la liaison du substrat JA (Zhang et al., 2021) (Figure II.6) exclut toute activité JAO chez cette protéine et d'autre part, Kawai et al. (2014) ont démontré qu'elle ne présentait pas d'activité FLS. Cependant, cette protéine sm79989 possède sur sa séquence un résidu cystéine très conservé chez les enzymes ANS/LDOX faisant d'elle une potentielle ANS (Figure II.6). De manière très intéressante, cette cystéine est également conservée dans la séquence de OsJAO4, celles de 3 orthologues des JAOs chez les céréales et les séquences de tous les orthologues JAOs présents chez la gymnosperme *P. abies*. Si cette cystéine s'avère déterminante pour l'activité ANS cela ferait donc de OsJAO4 une enzyme bifonctionnelle utilisant à la fois les substrats JA et leucoanthocyanidine pour former respectivement du OH-JA et de l'anthocyane. Une fonction ANS de OsJAO4 serait d'ailleurs cohérente avec les feuilles de couleur vert plus sombre des lignées d'*Arabidopsis* surexprimeurs *atjao2-2_OE-OsJAO4* qui accumuleraient plus d'anthocyanes que les plantes sauvages et les mutants *atjao2-2* (Figure II.10). La conservation potentielle de la fonction ANS chez OsJAO4, mais aussi chez les JAOs des gymnospermes, quelques JAOs des céréales et chez Sm79989, révélerait surtout un lien évolutif entre la fonction ANS et fonction JA Oxydase dont les acteurs actuels auraient comme ancêtre un gène de type ANS. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons de surexprimer les protéines OsJAO4, et sm79989 chez le mutant *atans* d'*Arabidopsis*, déficient en anthocyanes, afin de déterminer si ces protéines peuvent compléter la déficience de la protéine AtANS. Une étude des déterminants structure-fonction des activités ANS et JAO deviendrait alors pertinente.

Annexes chapitre II



Annexe II-1 : Volcano plots illustrant les composés différentiels entre les mutants et le WT parmi les composés identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS sur les feuilles des plantes.

L'analyse a été réalisée à l'aide de la plateforme Metaboanalyst. ($-1 < \log_2\text{FC} > 1$; $\text{p-value} < 0.1$)



Annexe II-2 : Comparaison du phénotype (floraison, stature des plantes et couleur des feuilles) de plantes d'*Arabidopsis* Col-0 (WT), *atjao2-2* et de mutants *atjao2-2* surexprimant les protéines OsJAO4 native (*atjao2-2_OE-OsJAO4*) et OsJAO4:p.308T>S (*atjao2-2_OE-OsJAO4S*) en génération T1.

Chapitre III:

CARACTERISATION DE LA COMPOSANTE JA_s-DEPENDANTE DE LA REPONSE AU SEL

A. Introduction

Du fait de leur caractère sessile, les plantes ont développé des mécanismes sophistiqués pour arriver à fixer tous les éléments dont elles ont besoin pour leur développement. Hormis le carbone, fixé principalement après absorption de CO₂ à travers les stomates, elles prélèvent préférentiellement les macro-éléments (azote, phosphore, potassium...) et oligo-éléments (fer, chlore, manganèse...) à travers les racines, en même temps que l'eau, avant qu'ils ne soient acheminés dans les tissus photosynthétiques pour leur intégration dans les molécules organiques. De ce fait, une croissance optimale des plantes requiert la disponibilité de l'eau et de ces éléments nutritifs dans leur milieu de culture mais surtout leur facilité d'absorption par les racines, souvent affectée par les stress abiotiques, notamment par le stress salin. Ce dernier est causé chez les plantes lorsque le sol contient de fortes concentrations de sel (principalement de NaCl) et devient très limitant pour les plantes lorsque la conductivité électrique (EC) du sol est supérieure ou égale à 4 dS m⁻¹ (~40 mM NaCl) (FAO et al., 2021; Munns and Tester, 2008).

1. Les composantes du stress salin et leurs incidences sur les plantes

La présence excessive de NaCl dans les sols perturbe les plantes de deux manières principalement (Yeo et al., 1991; Munns and Tester, 2008). Premièrement, les concentrations croissantes de NaCl entraînent une baisse du potentiel hydrique du sol. Dans les conditions optimales de culture, ce potentiel hydrique du sol est plus élevé que celui des racines, elles-mêmes ayant un potentiel hydrique plus élevé que les feuilles qui, en libérant de l'eau par évapotranspiration, crée un appel d'eau qui est le moteur principal de l'absorption d'eau et de nutriments par les racines (Passioura, 1982). Lorsque le potentiel hydrique du sol baisse à cause de la présence excessive de sel, l'absorption d'eau est alors perturbée et crée donc un stress osmotique pour les plantes (Figure III.1 & III.2). La deuxième principale perturbation causée par la salinité des sols est un stress ionique qui intervient après le transport de l'excédent de Na⁺ dans les cellules des tissus photosynthétiques où, à de fortes concentrations, le Na⁺ devient toxique (Figure III.1 & III.2). Ces stress ionique et osmotique s'accompagnent également d'un déséquilibre ionique ainsi que d'une accumulation excessive de ROS qui entraîne un stress oxydatif (Figure III.2) (Yeo et al., 1991; Munns and Tester, 2008).

Les effets du stress salin sur les plantes ont fait l'objet d'une multitude d'études, chez différentes espèces, qui ont permis d'établir la chronologie de mise en place des composantes osmotique et ionique et de distinguer les conséquences induites par chacune d'entre elles sur la physiologie des plantes affectées. La composante osmotique intervient très rapidement, de l'ordre de quelques minutes dans certains cas, et cause, à court terme, un flétrissement des feuilles du fait d'une perte d'eau non remplacée convenablement. A plus long terme, cette composante osmotique conduit à une réduction de croissance

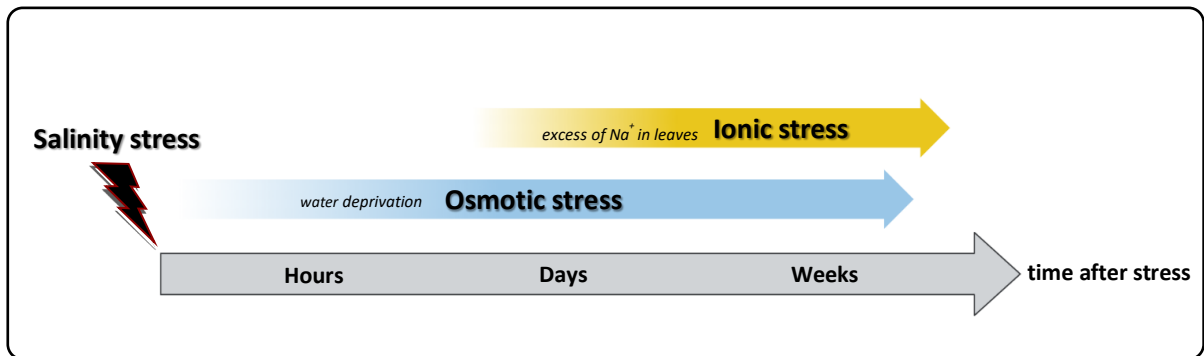


Figure III.2 : Chronologie de la mise en place des composantes osmotique et ionique du stress salin chez les plantes.

La composante osmotique intervient très rapidement, moins d'une heure, après l'exposition des plantes au stress salin du fait de la baisse du potentiel hydrique du sol ou de la solution de culture causée par la présence excessive de sel. Au fur et à mesure que l'excédent de Na^+ et de Cl^- est acheminé dans la partie aérienne des plantes, le Na^+ atteint, en quelques jours, des niveaux toxiques dans les feuilles déclenchant ainsi la composante ionique du stress salin.

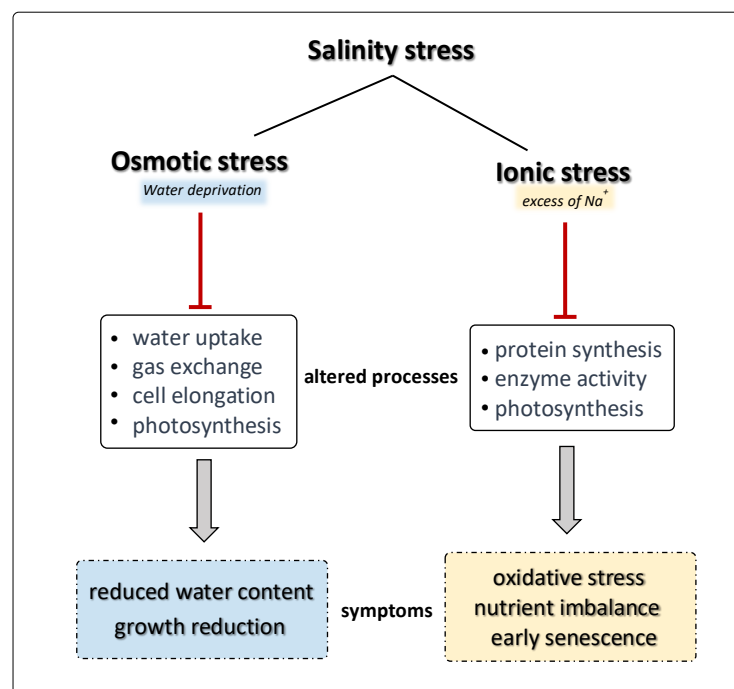


Figure III.1 : Les altérations physiologiques et les symptômes induits par les composantes osmotique et ionique du stress salin chez les plantes. Figure adaptée de Horie et al. (2012).

des plantes (Figure III.2) (Yeo et al., 1991; Munns and Tester, 2008). La composante ionique intervient plus lentement et se met en place avec le transport progressif de l'excédent de Na^+ des racines vers les feuilles avec une réduction concomitante du potassium (K^+) absorbé. Les concentrations fortes de Na^+ qui en résultent dans les feuilles entraînent, par conséquent, une interruption des processus métaboliques qui favorise la mise en place d'un stress oxydatif (Miller et al., 2010) et la déstabilisation de la machinerie photosynthétique (Alamgir and Ali, 1999; Cha-Um et al., 2007) (Figure III.2). La sénescence précoce des feuilles est la conséquence la plus apparente induite par le stress ionique (Lutts et al., 1996; Yeo and Flowers, 1983) même si celui-ci contribue également à la réduction de la croissance des plantes affectées par le stress (Munns and Tester, 2008).

2. Le Riz, une plante parmi les plus sensibles au stress salin

Les plantes présentent en effet des degrés de sensibilité différents à la salinité des sols et sont donc classées, sur cette base, en deux grands groupes (Munns and Tester, 2008). Le premier est formé de plantes tolérantes, appelées halophytes, capables d'accomplir un cycle de vie complet sur des sols fortement salinisés, avec des concentrations en sel avoisinant celles des eaux marines. Le deuxième groupe est constitué de plantes nettement plus sensibles où l'on retrouve pratiquement toutes les plantes alimentaires actuelles. Au sein de ces glycophytes, le Riz figure parmi les espèces les plus sensibles présentant des pertes de rendement dès $1,9 \text{ dS m}^{-1}$ de conductivité électrique du sol (Grattan et al., 2002). La salinité des sols est pourtant un problème majeur des terres arables, affectant les rendements d'un bon nombre de plantes agricoles. La FAO (Food and Agriculture Organization) estime les terres affectées par la salinité dans le monde à 660 millions d'hectares et prédit une perte de terres arables causée par la salinité à 1,5 million d'hectares par année (FAO et al., 2021). Dans ce présent contexte, la production de Riz, qui occupe le plus de terres arables après le maïs et le blé (OECD-FAO, 2021), devient très menacée d'autant plus que l'irrigation, principalement utilisée pour la culture de Riz, est l'une des causes majeures de la salinité (FAO et al., 2021). De ce fait, le développement et la sélection de variétés de Riz plus tolérantes au stress salin devient encore plus urgente pour les années à venir afin de maintenir une productivité suffisante pour couvrir la demande mondiale.

Les effets du stress salin ont pu être observés à différents stades de développement chez le Riz mais ceux-ci sont nettement plus pénalisants lorsque le stress est appliqué sur de jeunes plantules ou encore à des étapes précoces de la reproduction (exemple : stade d'initiation paniculaire) (Aslam et al., 1993; Zeng et al., 2001; Kaddah, 1963). En effet, le développement des jeunes plantules de Riz est particulièrement sensible au stress salin, notamment à sa composante osmotique. Cela se reflète par une réduction considérable de la croissance racinaire (Aslam et al., 1993) ainsi que celle de la partie aérienne, marquée par des feuilles plus petites et un nombre réduit de talles par plante (Zeng and Shannon, 2000; Aslam et al., 1993; Reddy et al., 2017). A plus long terme, ces effets du stress salin présentent des répercussions

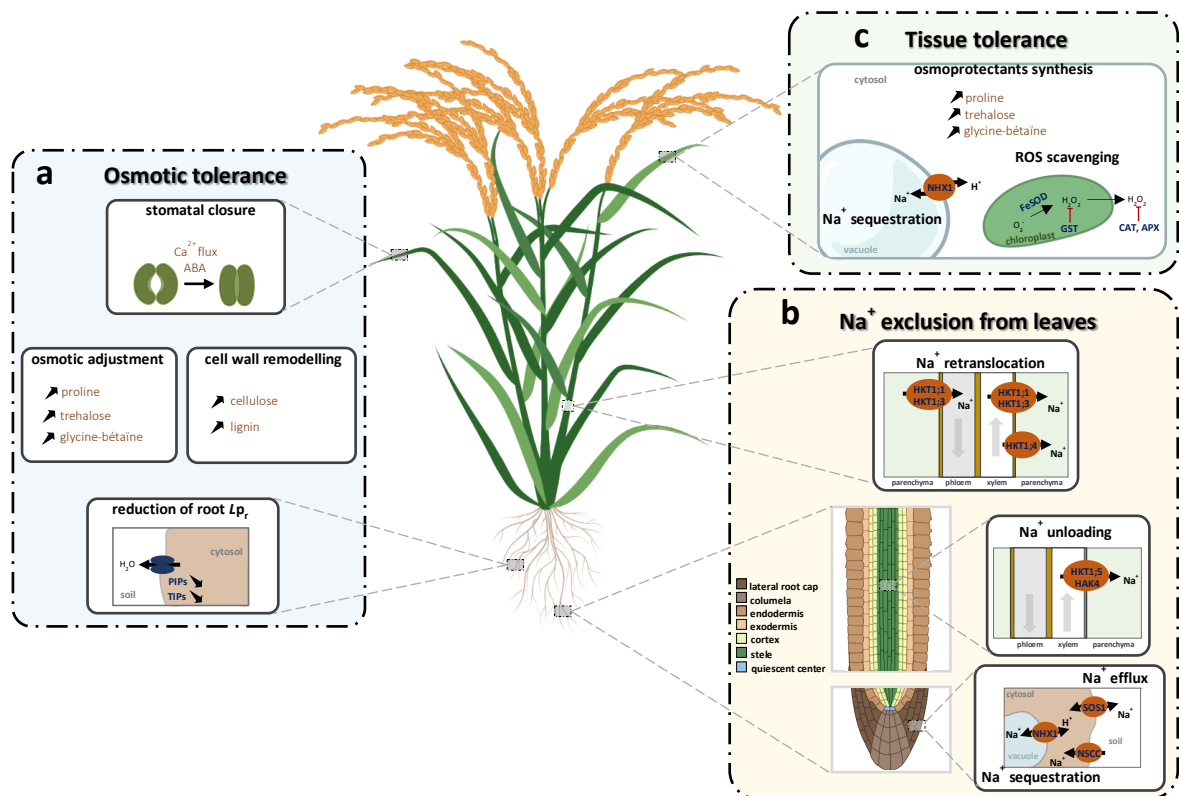


Figure III.3 : Les principaux mécanismes d'adaptation au stress salin chez les plantes.

Ceux-ci sont classés par Munns et al. (2008) en 3 principales catégories. **a.** La première, nommée tolérance osmotique, regroupe les mécanismes permettant de réduire les effets de la déprivation d'eau causée par le sel. L'accumulation d'osmoticum permet de réajuster le potentiel osmotique et de maintenir la turgescence des cellules. Dans les racines, la répression de l'expression des aquaporines TIPs et PIPs réduirait la conductivité hydraulique des racines (L_p) et les reflux d'eau. La fermeture des stomates, activée par l'ABA ou par les flux calciques, réduit les pertes d'eau dans les feuilles. La modification de la paroi cellulaire dans les racines et les feuilles contribue également à limiter les pertes d'eau. **b.** La deuxième catégorie, regroupent les systèmes de transport d'ions qui permettent de réduire le flux de Na^+ acheminé dans les feuilles. L'efflux de Na^+ par SOS1 dans le sol et la séquestration dans les vacuoles des cellules racinaires via NHX1 constituent les premières barrières capables de réduire ce flux de Na^+ . Le Na^+ peut encore être exclu du xylème racinaire par les transporteurs HKT1;5 et HAK4 réduisant davantage le Na^+ transféré dans les feuilles. La redistribution du Na^+ dans les pétioles ou, probablement, dans les feuilles âgées par les HKT1;1/3/4 est un mécanisme supplémentaire qui permet de préserver les limbes des jeunes feuilles de la toxicité du sodium. **c.** La troisième catégorie regroupe les mécanisme d'adaptation aux niveaux toxiques de Na^+ qui s'accumulent dans les feuilles et est dénommée « tolérance tissulaire ». Elle implique la séquestration du Na^+ dans les vacuoles, la synthèse d'osmoprotectants et la détoxification active des ROS. Les traits rouges (\rightarrow) indiquent une activité répressive des enzymes. Les flèches ascendantes (\nearrow) et descendantes (\searrow) indiquent respectivement l'augmentation et la réduction de l'abondance des transcrits/métabolites. Figure adaptée de Ponce et al. (2021).

négligentes sur le nombre de panicules (Zeng and Shannon, 2000), la productivité en graines (Aslam et al., 1993; Zeng et al., 2001; Grattan et al., 2002) et même sur la survie des plantes (Lutts et al., 1995). Lorsque le stress est appliqué à des stades précoces de la floraison, il ne présente pas d'effets majeurs sur la croissance mais il pénalise considérablement la productivité des plantes de Riz en causant, par exemple, le retard de la floraison (Grattan et al., 2002), la réduction de l'arborescence des panicules (Zeng et al., 2001) et la stérilité chez certaines variétés de Riz (Akbar and Yabuno, 1977). Ces pénalités induites par le stress salin sont appréciées à l'échelle agronomique à travers deux principaux paramètres que sont le rendement en graines et le rendement en paille, eux aussi fortement sensibles au stress salin (Aslam et al., 1993).

3. Les mécanismes de tolérance au stress salin

De nombreuses études se sont intéressées à la physiologie de la tolérance du stress salin chez les halophytes afin d'identifier les déterminants génétiques qui contrôlent les divers mécanismes de tolérance permettant la croissance de ces plantes sur des sols fortement salinisés. Ces mécanismes sont considérés, par une partie de la communauté scientifique, comme un potentiel à exploiter pour améliorer la tolérance des plantes agricoles, telles que le Riz, au stress salin. Certains marqueurs de tolérance identifiés chez des halophytes ont d'ailleurs déjà montré leur capacité à réduire la sensibilité stress salin de certains glycophytes lorsqu'ils sont exprimés chez ces plantes (Himabindu et al., 2016). D'autres marqueurs et mécanismes de tolérance ont été mis en évidence chez des glycophytes, à travers des études comparatives de variétés tolérantes au stress salin avec les plus sensibles d'une même espèce. Ces approches sont très communes chez les céréales et ont notamment permis de caractériser le transporteur de Na^+ SKC1/OsHKT1;5 comme un déterminant moléculaire de la tolérance de la variété de Riz Nona Bokra au stress salin (Lin et al., 2004; Ren et al., 2005). Globalement, la tolérance des plantes au stress salin repose sur la tolérance à au moins sa composante osmotique ou à sa composante ionique. Munns et al. (2008) ont d'ailleurs établi une classification des mécanismes de tolérance au sel en trois principales catégories (Figure III.3). La première concerne la tolérance au stress osmotique, qui est mise en place bien plus tôt, en réponse à la privation perçue au niveau des racines. La deuxième catégorie représente la tolérance au stress ionique qui consiste principalement en l'exclusion du Na^+ des tissus photosynthétiques, bien plus sensibles à la toxicité du Na^+ . La dernière catégorie est la tolérance tissulaire, mise en place dans les feuilles pour lutter contre la toxicité du Na^+ principalement par son exclusion du cytosol.

a. La tolérance à la composante osmotique

Les mécanismes de tolérance à la phase osmotique du stress salin ne sont pas encore très bien caractérisés chez les plantes et encore moins chez le Riz. Il est pourtant tentant d'assumer que les processus physiologiques en jeu sont très similaires à ceux qui permettent d'établir une réponse de tolérance au stress hydrique occasionné par exemple par la sécheresse. Ces mécanismes de tolérance, lorsqu'ils sont

mis en place, devraient permettre d'assurer une meilleure rétention d'eau dans les feuilles sans compromettre totalement l'absorption de CO₂ et l'activité photosynthétique pour prévenir la réduction de la croissance et le flétrissement des feuilles qui sont les symptômes majeurs de la déprivation d'eau (Figure III.3). Il est toutefois très difficile de déterminer si la réduction de croissance des feuilles est une simple conséquence de la déprivation d'eau ou une stratégie d'adaptation (Munns and Tester, 2008). Dans les conditions optimales de culture, le développement des racines et des feuilles est bénéfique à la plante par le fait qu'il augmente la surface de fixation du CO₂ ou d'échange d'eau. Cependant, dans des conditions aussi contraignantes que le stress salin, où l'apport d'eau et de nutriments est limité, réduire la croissance pourrait constituer une stratégie d'optimisation des ressources disponibles. Il est toutefois connu, chez différentes espèces, que la croissance de la racine peut être réorientée en fonction des disponibilités d'eau suivant un mécanisme appelé hydrotropisme (Dietrich, 2018). Lorsque la croissance racinaire est réorientée suite à la perception de concentration forte de sel, le mécanisme est plutôt dénommé « salt-avoidance tropism » (Li and Zhang, 2008).

Le flétrissement des feuilles est quant à lui le reflet d'une perte excessive d'eau couplée à un apport limité par les racines (O'Toole and Moya, 1978). La réduction de la surface de transpiration foliaire (Le Gall et al., 2015) et la réduction de la conductance stomatale sont deux stratégies permettant de limiter les pertes d'eau (O'Toole and Cruz, 1980). La réduction de la surface des feuilles implique très probablement une modification de la paroi cellulaire via un mécanisme pas encore bien défini (Le Gall et al., 2015). On sait que les dépôts de lignine induits par le stress salin contribuent au renforcement mécanique de la paroi cellulaire et à la préservation de l'intégrité de la membrane (Chun et al., 2019). Chez *Arabidopsis*, la synthèse de cellulose est très déterminante pour la tolérance au sel puisque l'inactivation des gènes de biosynthèse de la cellulose conduit souvent à un phénotype d'hypersensibilité au sel (Zhang et al., 2016b; Kang et al., 2008). L'importance de l'hémicellulose et des pectines pour la tolérance au sel a été explorée dans plusieurs études mais les conclusions sont peu concordantes. Quant à la conductance stomatale, on sait qu'elle est étroitement régulée par des flux rapides du Ca²⁺ cytosolique (Yuan et al., 2014) générés par des osmosenseurs tels que AtOSCA1.1, un canal calcique favorisant la fermeture rapide des stomates après un stress hydrique chez *Arabidopsis* (Figure III.3). L'expression ectopique des orthologues de Riz d'AtOSCA1.1 chez le mutant *atosca1.1* a montré que OsOSCA1.1, OsOSCA1.4 et OsOSCA2.2 sont capables de compléter la déficience d'AtOSCA1.1 mais l'importance de ces canaux calciques dans la régulation de la conductance stomatale chez le Riz reste à définir (Zhai et al., 2020, 2021). L'ABA est un autre activateur majeur de la fermeture des stomates lors de stress hydriques (Figure III.3). La perception d'ABA dans les cellules de garde crée également un flux de Ca²⁺ cytosolique qui entraîne un efflux d'ions par les canaux anioniques (S-type et R-type) et la fermeture des stomates (Kim, 2011). Lors du stress salin, on sait que la biosynthèse d'ABA est induite chez le Riz dès les premières heures après la perception du stress (Hazman et al., 2015). Les différences de tolérance à la composante osmotique du stress salin pourraient alors dépendre du degré de sensibilité à l'ABA des plantes ou aux niveaux d'ABA

produit. L'inactivation de deux gènes clés de la voie de biosynthèse de l'ABA, *OsNCED3* et *OsNCED5*, réduit d'ailleurs considérablement la tolérance des mutants à la sécheresse et au stress salin, certainement à cause de niveaux d'ABA réduits et une baisse de leur capacité à fermer les stomates suite à ces stress (Huang et al., 2018, 2019). Outre la fermeture des stomates, l'ABA est aussi un régulateur positif de la synthèse de proline (Cao et al., 2020), un osmoprotectant tout comme la glycine-bétaïne et le tréhalose qui, en s'accumulant dans les cellules, équilibre la différence osmotique entre l'environnement direct de la cellule et le cytosol et contribue à la tolérance au stress osmotique (Hussain Wani et al., 2013; Kosar et al., 2019). La réduction de la conductivité hydraulique racinaire (L_p) est également une réponse observée chez différentes espèces soumises à un stress salin/osmotique important (Horie et al., 2012) (Figure III.3). On sait qu'elle implique particulièrement la redistribution et la régulation de l'expression des aquaporines PIP (plasma membrane intrinsic protein) et TIP (tonoplast intrinsic protein) (Boursiac et al., 2005) mais son influence réelle sur la tolérance des plantes à la déprivation d'eau reste encore à définir.

b. La réduction du flux de Na^+ vers les feuilles

Ce phénomène consiste à limiter le transfert de Na^+ des racines vers les feuilles et repose essentiellement sur l'activité et l'expression des transporteurs par lesquels le Na^+ traverse les différents tissus pour accéder aux feuilles (Figure III.3). Ces transporteurs de Na^+ sont retrouvés parmi plusieurs familles de transporteurs de cations qui sont classés selon leur mode de transport et leur sélectivité pour les différents cations (Eva van et al., 2020; Kronzucker and Britto, 2011; Ponce et al., 2021; Saier Jr, 2000). On a les canaux cationiques non sélectifs (NSCC) qui, comme leur nom l'indique, transportent les cations de manière très peu sélective (Flockerzi, 2008). On soutient que ce sont les principaux transporteurs permettant l'entrée de sodium dans les racines (Kronzucker and Britto, 2011) (Figure III.3). Les systèmes d'antiporteurs cation/proton (CPA), en particulier la famille des CPA de type 1 (CPA1), contribuent également au transport de Na^+ (ou de K^+) (Dong et al., 2018). Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie des concentrations de K^+ et Na^+ et le contrôle du pH dans les différents compartiments cellulaires. Les plus connus chez les plantes sont les Na^+/H^+ EXCHANGER (NHX, des CPA1 transportant spécifiquement du Na^+), SOS1 (*SALT OVERLY SENSITIVE 1* - également un NHX) et les Cation/ H^+ EXCHANGER (CHX). D'autres transporteurs de Na^+ ont été identifiés, plus récemment (Benito et al., 2012; Zhang et al., 2019), au sein de la famille KUPHAKKT (respectivement pour "K⁺ Uptake" , "High Affinity K⁺ Uptake" et "K⁺ Transport") présente uniquement chez les végétaux, champignons et bactéries et dont les membres ont longtemps été considérés comme des transporteurs sélectifs du K^+ (Rodríguez-Navarro and Rubio, 2006). Cependant, des études ont pu démontrer que des HAK du groupe IV chez *P. patens*, *Z. mais* et *O. sativa* présentent une sélectivité pour le Na^+ (Benito et al., 2012; Zhang et al., 2019). Enfin, la famille des transporteurs HKT (*HIGH AFFINITY K⁺ TRANSPORTER*) contient les transporteurs de Na^+ les mieux caractérisés chez les plantes (Platten et al., 2006). Les transporteurs sélectifs de Na^+ parmi les HKT forment la sous-famille I et sont caractérisés par

la présence d'une sérine sur la première P-loop des protéines HKT, qui correspond, chez la majorité des membres de la sous-famille II, à une glycine (Mäser et al., 2002).

Le Na^+ présent dans le sol pénètre dans les racines de manière passive principalement via des canaux de type NSCC (Figure III.3) et potentiellement des HKT (Horie et al., 2012) et emprunte ensuite les voies apoplasmique et symplasmique pour atteindre le xylème (Barberon and Geldner, 2014). Toutefois, le cadre de caspary constitue une barrière qui force le Na^+ et l'eau à réintégrer la voie symplasmique entre le cortex et la stèle grâce à des transporteurs NSCC (Demidchik and Tester, 2002; Demidchik and Maathuis, 2007) et probablement des transporteurs de Na^+ de la famille des HKT (Laurie et al., 2002). Une fois dans la stèle, le Na^+ regagne l'apoplasme d'où il passe vers le xylème. Cependant, le flux de Na^+ acheminé du sol vers le xylème est progressivement réduit grâce à des systèmes d'efflux et de séquestration de Na^+ impliquant les systèmes de transport de Na^+ . La tolérance à la toxicité du Na^+ repose d'ailleurs principalement sur l'activité et l'expression de transporteurs impliqués qui fonctionnent à travers deux stratégies (Munns and Tester, 2008; Horie et al., 2012).

i. Restriction de l'entrée du Na^+

Elle est principalement médiée par les systèmes d'antiports de la famille CPA1 qui, depuis la membrane plasmique ou le tonoplaste, participent à la réduction du flux racinaire de Na^+ avant son relargage dans le xylème (Figure III.3). Le premier CPA1 identifié pour cette fonction est la protéine AtSOS1/NHX7, un antiporteur localisé sur la membrane plasmique et particulièrement exprimé dans l'épiderme de l'apex racinaire chez *Arabidopsis* (Zhu et al., 1998; Shi et al., 2002). En présence de fortes concentrations de NaCl dans le sol/milieu de culture, l'activité de AtSOS1 est très déterminante pour réduire le Na^+ transporté vers les feuilles comme le démontrent les teneurs élevées de Na^+ observées dans le xylème et les feuilles des mutants *sos1* d'*Arabidopsis*, comparé aux plantes sauvages (Shi et al., 2002). AtSOS1 est en réalité activée par le complexe kinase SOS2-SOS3 qui est lui-même activé grâce aux flux calciques générés par la présence excessive de Na^+ (Shi et al., 2002; Qiu et al., 2002). Les homologues fonctionnels des AtSOS1 et des protéines SOS2 et SOS3 sont identifiés chez le Riz et chez l'Orge, suggérant la conservation, également chez les céréales, d'un mécanisme d'efflux de Na^+ similaire à celui qui opère chez *Arabidopsis* (Lonergan et al., 2009; Rivandi et al., 2011; Martínez-Atienza et al., 2007). L'inactivation de la protéine OsSOS1 chez le Riz résulte par ailleurs en une forte sensibilité au sel du mutant *sos1*, corrélée à des teneurs élevées en Na^+ dans les feuilles (Mahi et al., 2019). La deuxième stratégie de réduction du flux racinaire de Na^+ se fait par la séquestration de l'excédent de Na^+ cytosolique dans les vacuoles. Elle est médiée par des CPA1 tonoplastiques, au nombre de 4 chez le Riz et *Arabidopsis* (NHX1-4), exprimés dans les racines et dans les feuilles (Pardo et al., 2006; Fukuda et al., 2011). La surexpression de OsNHX1 et AtNHX1 respectivement chez le Riz et *Arabidopsis* améliore la tolérance au sel des plantes transgéniques suggérant que ces NHX sur les tonoplastes jouent des rôles importants

dans la compartimentation de Na⁺ cytoplasmique dans les vacuoles lors du stress salin (Apse et al., 1999; Fukuda et al., 2004).

ii. Exclusion du Na⁺ du xylème et des tissus photosynthétiques

Il s'agit d'une barrière supplémentaire qui permet de prévenir l'accumulation excessive de Na⁺ dans les feuilles (Figure III.3). Deux mécanismes principaux sont décrits dans cette stratégie. Le premier consiste en la réabsorption d'une partie du Na⁺ versé dans le xylème vers les tissus qui l'entourent afin de réduire le flux de Na⁺. Le deuxième intervient en aval et permet d'éviter l'accumulation du Na⁺ qui parvient aux feuilles en le faisant recirculer dans le phloème. Les acteurs protéiques sont principalement des transporteurs HKT de classe I qui transportent sélectivement du Na⁺. AtHKT1;1, le seul HKT codé dans le génome d'*Arabidopsis*, est impliqué aussi bien dans l'efflux de Na⁺ du xylème que dans sa recirculation à travers le phloème (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007). Ceci, grâce à son expression dans les tissus vasculaires des racines et des feuilles (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005). Son rôle déterminant dans la tolérance au stress salin est illustré par le phénotype hypersensible des mutants *athkt1*. Le génome de Riz code pour 4 *HKT* de classe I, tous impliqués dans le dessalage des feuilles mais depuis des tissus différents. L'activité de OsHKT1;5, exprimé majoritairement dans les cellules du parenchyme xylémien des racines, est déterminante pour l'efflux du Na⁺ depuis le xylème racinaire pour limiter son ascension dans les feuilles (Ren et al., 2005). Les transporteurs OsHKT1;1 et OsHKT1;3 bien plus exprimés dans les feuilles seraient essentiellement impliqués dans la re-translocation du Na⁺ qui parvient à ces tissus dans les pétioles ou vers les feuilles âgées (Wang et al., 2015; Jabnune et al., 2009; Campbell et al., 2017; Al-Shiblawi, 2017). OsHKT1;4, le quatrième HKT de classe I chez le Riz, contribue aussi à la re-translocation du Na⁺ au niveau des tissus aériens mais plus tard, aux stades reproductifs (Suzuki et al., 2016). Le dessalage du xylème racinaire implique également le transporteur OsHAK4 de Riz, un des rares transporteurs HAK sélectif du Na⁺ et préférentiellement exprimé dans la stèle racinaire (Zhang et al., 2019). Sa fonction n'a pas encore été étudiée chez le Riz mais l'inactivation de son homologue fonctionnel ZmHAK4 chez le maïs augmente la sensibilité au sel des mutants *zmhak4* qui accumulent bien plus de Na⁺ dans les feuilles que les plantes sauvages (Zhang et al., 2019).

c. La tolérance tissulaire au stress salin

Dans les feuilles, l'effet toxique du Na⁺ qui entre dans les cellules peut être atténué par la mise en place de réponses physiologiques et par la séquestration vacuolaire du Na⁺. Cette dernière, associée plus tôt à la réduction du flux de Na⁺ racinaire, intervient également dans les feuilles avec toujours comme acteurs protéiques les transporteurs NHX tonoplastiques (Figure III.3). La séquestration vacuolaire du Na⁺ permet de maintenir sa concentration cytosolique faible malgré les quantités élevées qui parviennent aux feuilles et ainsi d'atténuer l'inhibition des activités métaboliques et photosynthétiques. Elle a été particulièrement

associée à la tolérance au sel du Riz sauvage *Oryza rufipogon* qui présente pourtant des teneurs en Na^+ dans les feuilles aussi élevées que la variété sensible au sel Koshihikari (*O. sativa subsp. japonica*) (Solis et al., 2021). La séquestration du Na^+ a également la particularité d'augmenter la pression osmotique vacuolaire qui est rééquilibrée dans le cytosol par la synthèse et l'accumulation d'osmoticum compatibles avec les réactions métaboliques comme la proline, la glycine-bétaïne et le tréhalose (Rhodes and Rich, 2002; Nahar et al., 2015) (Figure III.3). Ces derniers sont également appelés osmoprotectants pour leur capacité à stabiliser les structures des protéines (Autona et al., 2011; Nahar et al., 2015). Lors du stress salin, la toxicité du Na^+ associée à la baisse de la photosynthèse dans les chloroplastes augmente considérablement la formation de ROS à l'origine du stress oxydatif et de la sénescence précoce des feuilles. Le stress oxydatif résulte surtout de l'inefficacité de la machinerie de détoxification des ROS présente dans les cellules à éliminer ces quantités massives de ROS produites (Demidchik, 2015). Il a été démontré que l'amélioration du pouvoir antioxydant des plantes par la surexpression simultanée ou singulière d'enzymes de détoxification des ROS telles que des « superoxide dismutases » (SOD), des « ascorbate peroxidases » (APX) et des catalases (CAT) permet d'atténuer le stress oxydatif et de réduire les dommages causés par le sel (Hossain and Dietz, 2016; Luo et al., 2013; Lu et al., 2007) (Figure III.3).

4. Le rôle des JAs dans la régulation des mécanismes de tolérance

A l'image du complexe d'efflux de Na^+ SOS1-SOS2-SOS3, activé par les flux de Ca^{2+} cytosoliques induits par la présence excessive de sel Na^+ (Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002), la mise en place de la plupart des mécanismes de tolérance au sel décrits plus hauts est coordonnée par différents réseaux de signalisation, médiées par des récepteurs membranaires de Na^+ tels que GIPC (glycosyl inositol phosphorylceramide - Jiang et al., 2019) ou de dommages induits par le sel tels que FERONIA (Feng et al., 2018), par des canaux calciques (encore non définis) ou encore par les différentes voies hormonales des plantes (Yu et al., 2020). L'ABA est, à ce jour, la phytohormone dont l'impact dans la tolérance des plantes au sel est le mieux exploré. Sa fonction la mieux décrite dans la réponse au stress salin est la régulation de la fermeture des stomates qui permet une meilleure rétention d'eau dans les feuilles des plantes soumises au stress salin (Huang et al., 2018, 2019). L'importance des 8 autres principales hormones végétales jasmonates (JAs), éthylène, acide salicylique (SA), auxine, gibbérelline (GA), cytokinines (CKs), brassinostéroïdes (BRs) et strigolactones (SLs) dans la tolérance des plantes au sel a également été investi dans différentes études. Ces travaux sont généralement menés sur la base des perturbations nettes du métabolisme et de la signalisation de ces hormones observées chez des plantes soumises au stress salin ainsi que sur la base de phénotypes très particuliers, après un stress salin, des mutants déficients sur une étape de la synthèse et de la signalisation de ces hormones. Yu et al. ont répertorié, dans leur récente revue (Yu et al., 2020), différentes réponses des plantes au stress salin dans lesquelles ces hormones joueraient des rôles plus ou moins déterminants. Celles-ci comprennent notamment la régulation du développement des racines (Auxines) et de la partie aérienne (GA, BRs, CKs),

la régulation de la fermeture des stomates (ABA, CKs), la détoxification des ROS (JA, SA, ABA, BRs) ainsi que la régulation de la synthèse et la signalisation de l'ABA (JA, SLs, GA, éthylène, CKs).

L'implication des JAs chez les plantes, bien mieux caractérisée dans les réponses de défenses contre les agressions biotiques, a également été relevée dans la réponse au stress salin, bien que peu définie. D'abord, par le constat que la biosynthèse et la signalisation JAs sont généralement activées par le stress salin chez différentes espèces (Valenzuela et al., 2016; Chen et al., 2016; Hazman et al., 2015). De plus, l'apport externe de JAs influence considérablement les réponses des plantes au stress salin résultant selon l'espèce et le mode d'application, à une amélioration ou une aggravation des symptômes (Farhangi-AbRiz and Ghassemi-Golezani, 2018; Chen et al., 2017; Qiu et al., 2014). L'application externe de JAs, chez le soja et le blé, améliore la tolérance des plantes au stress salin, entre autres, en stimulant la machinerie de détoxification des ROS (Qiu et al., 2014; Farhangi-AbRiz and Ghassemi-Golezani, 2018). Chez le soja, les JAs favorisent également une meilleure rétention d'eau dans les feuilles lui conférant un rôle positif dans la réponse à la composante osmotique du stress salin (Farhangi-AbRiz and Ghassemi-Golezani, 2018). En revanche, l'exposition simultanée des plantules d'*Arabidopsis* au JA exogène et au sel provoque une aggravation des symptômes induits naturellement par le sel, notamment la sénescence et le retard de croissance (Chen et al., 2017). Ces effets opposés décrits chez ces différentes espèces posent donc un sérieux débat sur l'influence réelle de la signalisation JAs sur la mise en place des mécanismes de tolérance des plantes au stress salin. Cependant, le rôle des JAs dans la régulation de certaines des composantes du stress salin a été mieux décrit, ce qui fournit des indices pour la compréhension des mécanismes complexes de réponse au sel. Par exemple, la réponse à la déprivation d'eau causée par la sécheresse est positivement régulée par les JAs (Ndiaye et al., 2022; Kim et al., 2017; Mohamed and Latif, 2017). La sénescence précoce des feuilles induites par exemple par l'obscurité (*Dark Induced Senescence* – DIS) est également positivement régulée par les JAs (Lim et al., 2020; Zhuo et al., 2020; Uji et al., 2017). Plusieurs études soutiennent que les JAs ont une influence sur l'homéostasie des ions probablement à travers la régulation transcriptionnelle de gènes de transporteurs ioniques (Wu et al., 2015; Farhangi-AbRiz and Ghassemi-Golezani, 2018; Garcia-Abellan et al., 2015).

Chez le Riz, les études qui s'intéressent aux fonctions des JAs dans la réponse au stress salin, utilisant principalement des lignées affectées dans la biosynthèse ou la signalisation, semblent globalement s'accorder sur un rôle négatif des JAs dans la tolérance aux stress. D'abord, il a été montré que la pénalité de croissance induite par le stress salin est nettement moins prononcée lorsque la signalisation JAs est réprimée grâce à la surexpression du répresseur JAZ9 (Ye et al., 2009). De plus, les mutants déficients en JAs, *cpm2* et *hebiba*, semblent moins sensibles au stress salin, présentant des symptômes nécrotiques bien moins prononcés que les plantes sauvages de Riz (Hazman et al., 2015). Cette différence phénotypique est associée, dans les feuilles, à des teneurs en Na⁺ plus faibles et certaines activités de détoxification des ROS plus importantes chez les mutants comparés aux plantes WT. Pendant le déroulement de cette thèse,

des observations très similaires ont été faites par une autre équipe de recherche chez le mutant *opr7opr8* de Maïs, déficient en JAs, puisque décrit comme moins sensible que la plantes sauvage au stress salin (Ahmad et al., 2019). La sensibilité plus forte des plantes sauvages de Riz et de Maïs au stress salin pourrait donc être une conséquence de l'influence négative de la signalisation JAs sur l'homéostasie du Na⁺ et l'activité des enzymes de détoxification des ROS. Cette influence négative de la signalisation JAs sur la tolérance du Riz au sel, est d'ailleurs soutenue par Kurotani et al. (2015a) qui ont démontré que la suractivation du catabolisme de l'hormone active JA-Ile grâce à la surexpression de la CYP94C2b améliore le taux de survie des plantes de Riz au stress salin.

5. Objectifs du projet

Sur ce second projet, nous nous intéressons spécifiquement aux réponses JAs-dépendantes en conditions de stress salin. La déficience en Jasmonates chez les mutants *cpm2* et *hebiba*, due à l'inactivation du gène *AOC*, est associée à une moindre sensibilité au stress salin comparé au plantes WT (Hazman et al., 2015). Nous partons de l'hypothèse que la connaissance des cibles des JAs impliquées dans la mise en place des mécanismes de tolérance au stress salin nous permettrait de déterminer bien plus clairement l'influence de la signalisation JAs sur la tolérance du sel chez le Riz ainsi que chez d'autres espèces de plantes. Pour ce faire, nous avons mis en place une étude comparative du transcriptome (RNAseq) des plantes sauvages (WT) de Riz avec celui d'un mutant déficient en JAs (*aoc*) avant et après un stress salin. Nous comptons donc sur l'exploitation des données transcriptomiques de ces deux génotypes, associées également à une analyse non ciblée de leur métabolome ainsi que différents tests physiologiques pour parvenir à identifier les marqueurs moléculaires pouvant expliquer les différences phénotypiques observées entre les plantes WT et le mutant *aoc*.

B. Résultats

Il est important de noter que tous les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés en utilisant le cultivar de Riz Kitaake (*O. sativa* ssp japonica) à cycle de vie plus court que les cultivars habituellement utilisés dans la recherche (Jain et al., 2019). Un autre avantage à utiliser ce cultivar Kitaake est qu'un nouveau mutant *aoc*, généré par Antony Champion (IRD, Montpellier) par mutagenèse ciblée avec l'outil d'édition de génome CRISPR Cas9 (Nguyen et al., 2019a). Les mutations *cpm2* et *hebiba* utilisés par Hazman et al. (2015) sont dues à des délétions génomiques plus larges qui touchent le gène codant l'enzyme AOC impliquée dans une étape précoce de la voie de biosynthèse des JAs. Ces lignées avaient été isolées du cultivar de Riz Nihon massari (ssp Japonica) après mutagenèse aléatoire par irradiation aux rayons gamma (Riemann et al., 2013). L'utilisation du mutant *aoc* généré par CRIPSR Cas9 permet de lever tout doute quant au potentiel impact des autres régions altérées du génome des mutants *cpm2* et

hebiba. Nous avons donc commencé par redéfinir les conditions expérimentales chez Kitaake afin d'observer les phénotypes induits par le stress salin.

1. Mis au point du protocole d'application du stress salin

a. Les difficultés de reproduction du phénotype de tolérance des mutants déficitaires en JA

La première expérience réalisée avait pour objectif de définir la concentration de NaCl qui permettrait de reproduire le phénotype décrit par Hazman et al. (2015) sur le cultivar Kitaake. Pour ce faire, nous avons repris les mêmes conditions de culture décrites sur cette dernière publication pour soumettre des plantules sauvages Kitaake à trois concentrations de NaCl différentes (100 mM, 150 mM et 175 mM de NaCl). Pour réussir un phénotypage efficace du nombre important de plantes cultivées sur les différentes conditions salines, le mutant *aoc* n'avait alors pas été inclus dans cette expérience pilote. Après trois jours de stress salin, on observe que les plantules soumises à la solution saline à 175 mM de NaCl sont sévèrement affectées par le stress, présentant une nette réduction et un assèchement des feuilles 2 et 3 (Figure III.4). La réduction de croissance due au stress salin est moins drastique sur les plantes soumises à la solution saline à 150 mM qui présentent néanmoins un assèchement des feuilles 2 et 3. Les plantes soumises à la solution saline à 100 mM sont peu affectées par le stress induit qui ne provoque qu'un assèchement modéré de la pointe des feuilles 3 de ces plantes. Il est important de noter que contrairement à ce qui est décrit par Hazman et al. (2015), aucun symptôme de nécrose n'est observé sur les pointes des feuilles des plantes après trois jours de stress salin. Sur la base des différences phénotypiques des plantules soumises aux 3 solutions salines, nous avons décidé de travailler pour la suite des travaux avec une solution saline à 150 mM puisqu'elle suffit à induire des symptômes suffisamment importants pour permettre plus tard une comparaison avec les mutants *aoc*.

La deuxième expérience de stress salin a été réalisée avec la solution saline à 150 mM de NaCl pour tester comparativement la sensibilité des plantes WT et *aoc*. L'expérience a été conduite en parallèle dans deux armoires de culture qui diffèrent par leur capacité à maintenir une humidité relative forte à l'intérieur de l'armoire (Figure III.5). L'armoire A est de type Sanyo dotée d'un système d'humidification qui permet de maintenir une forte humidité relative de l'environnement de culture, fixée donc à 60 % tout au long de l'expérience. L'armoire B est de type Percival dans laquelle l'humidité relative n'est pas contrôlée. Elle y est mesurée en deçà de 50 %. Le Riz étant une plante tropicale nécessitant une forte humidité relative pour sa culture, nous avons voulu déterminer si l'humidité de l'environnement pourrait avoir un impact sur l'apparition des symptômes induits par le stress salin. Après trois jours d'exposition au sel, nous avons été surpris d'observer que les mutants *aoc* sont nettement plus affectés par le stress induit (Figure III.5). Chez les plantules *aoc* exposées au sel, la deuxième feuille est la feuille qui a complètement émergé et est desséchée. Le stress salin entraîne également un retard de croissance sur les plantules WT mais leur 3^{ème} feuille, déjà émergée, n'est asséchée que sur la pointe. Au-delà des différences phénotypiques entre les

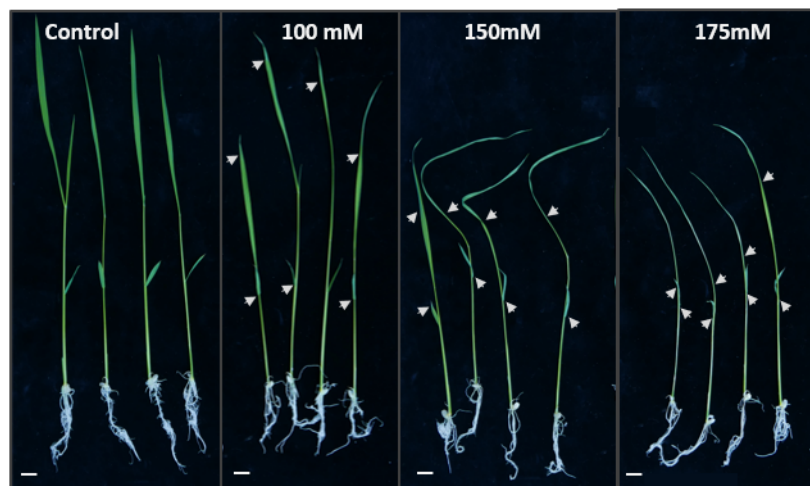


Figure III.4 : **Phénotype de plantules sauvages (WT) exposées à des solutions salines à concentrations de NaCl différentes.**

Les plantules WT de 10 jours, cultivées en hydroponie, ont été exposées pendant 3 jours aux solutions salines indiquées. Les flèches blanches indiquent la limite basse de la partie des feuilles affectée par l'assèchement induit par le stress salin. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

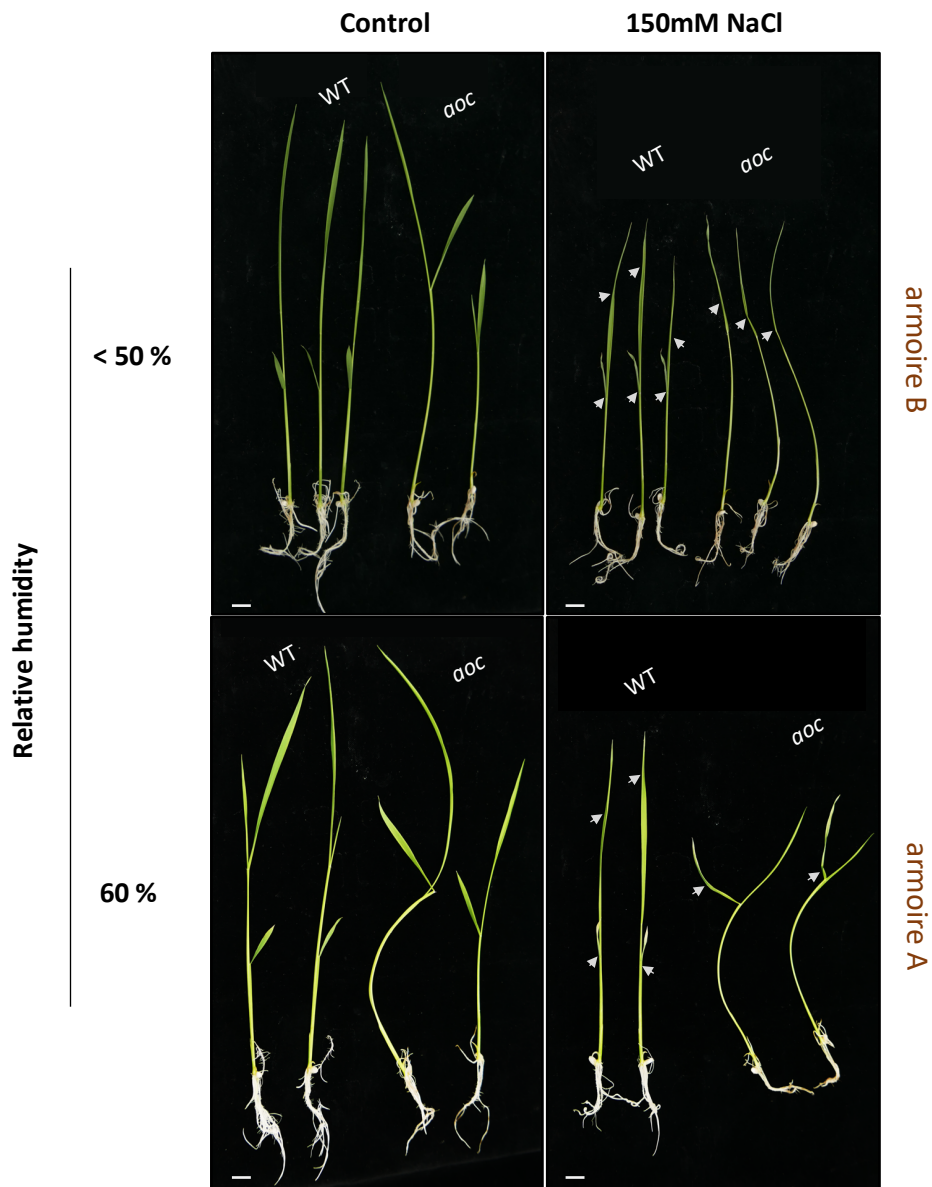


Figure III.5 : **Impact de l'humidité relative de l'environnement de culture des plantules de Riz sur leur croissance et les symptômes induits par l'application du stress.**

Deux expériences de stress salin ont été conduites en parallèles dans les armoires de cultures A et B qui diffèrent par l'humidité relative de l'environnement de culture. L'armoire de culture A permet un contrôle de l'humidité relative qui est alors maintenue à 60 % tout au long de l'expérience. L'armoire de culture B ne permet pas de contrôler l'humidité relative, toujours mesurée à moins de 50 %. Sur les deux expériences conduites, des plantules WT et aoc de 10 jours, cultivées en hydroponie, ont été exposés pendant 3 jours à des solutions de cultures normales ou saline (150 mM NaCl). Les flèches blanches indiquent la limite basse de la partie des feuilles affectée par l'assèchement induit par le stress salin. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

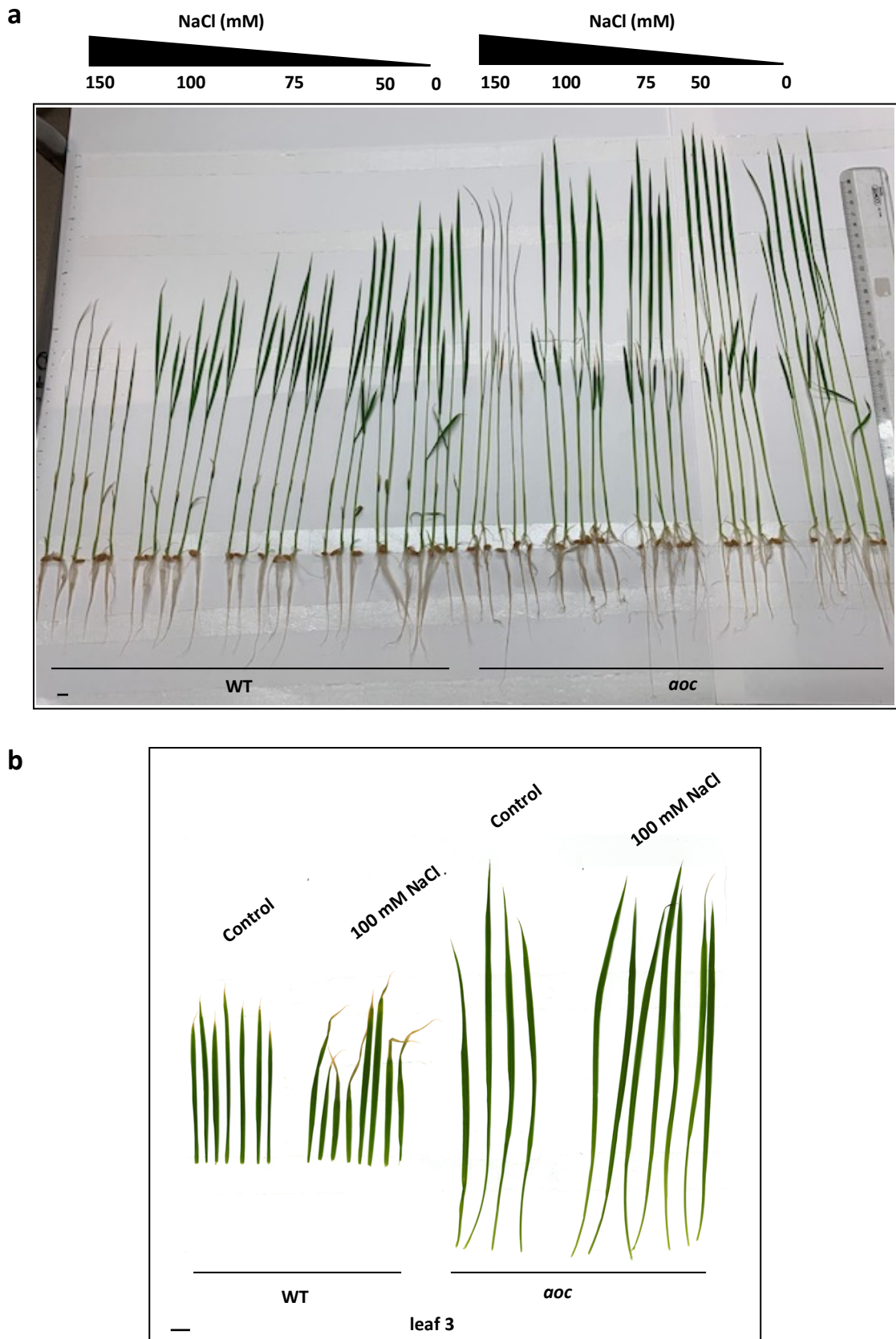


Figure III.6 : **Phénotype de plantules sauvages (WT) et de mutants déficients en JAs (*aoc*) exposés à des solutions salines à concentrations de NaCl différentes.**

Des plantules WT et *aoc* de 12 jours, cultivées en hydroponie, ont été exposés pendant 6 jours aux solutions salines indiquées **a**. Photographie des plantules de Riz après 3 jours de stress salin. **b**. Photographie des feuilles 3 des plantules WT et *aoc* après 6 jours de stress salin appliqué avec la solution saline à 100 mM de NaCl. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle

génotypes, il est important de noter qu'une nette différence est perceptible entre les plantes cultivées dans les deux armoires de cultures. La forte humidité relative dans l'armoire A semble favoriser la croissance des plantules comme l'illustre l'émergence de la 4^{ème} feuille des plantes WT contrôle, absente sur les plantes WT contrôle cultivées dans l'armoire B. Cette différence est aussi perceptible en conditions de stress, notamment sur les plantules *aoc* sur lesquelles la pointe de la future 3^{ème} est apparente dans l'armoire A contrairement aux plantules dans l'armoire B. Cependant, la sensibilité accrue des mutants *aoc* au stress induit comparée à celle des plantules sauvages, est très opposée aux observations de Hazman et al. (2015). Il se posait alors un problème de reproductibilité des travaux de Hazman et al. (2015), d'autant plus que la nécrose décrite n'est toujours pas observable sur les feuilles des plantes exposées au sel et ceci bien que les mêmes conditions et chambres de cultures aient été utilisées.

b. *aoc* plus tolérant lorsque les concentrations salines sont faibles

Ces expériences de stress salin ont successivement été reproduites sur différents sites : à l'IBMP (Strasbourg) et chez nos partenaires au KIT Karlsruhe et à l'IRD Montpellier pour déterminer les raisons des différences sur nos expériences et celles de Hazman et al. (2015). Seules celles faites à Montpellier ont montré une meilleure tolérance au sel du mutant *aoc*. Il est apparu, au regard de toutes ces expériences de stress salin, que la meilleure tolérance au sel des plantes déficientes en JAs (*aoc*) ne s'observait que lorsqu'on utilise une concentration de NaCl inférieure à 150 mM, en conditions d'humidité élevée. Le retard de croissance et le flétrissement de feuilles observés chez les plantes de Riz après exposition au sel (NaCl, 150 mM) sont des symptômes principalement associés à la composante osmotique du stress salin qui est d'autant plus importante que la concentration de sel autour des racines est importante (Bolaños and Longstreth, 1984). Sur cette base, lors de mon séjour à Montpellier, nous avons réalisé une expérience au cours de laquelle le stress salin a été appliqué en utilisant différentes concentrations de sel pour comparer les comportements de nos deux génotypes aux différentes concentrations salines utilisées. Cette expérience a montré que le retard de croissance et le flétrissement de feuilles apparaissaient dès 3 jours chez les plantes exposées à une concentration saline de 150 mM, avec toujours une plus grande sévérité des symptômes chez le mutant *aoc* (Figure III.6.a). Cependant, chez les plantes de Riz exposées à des concentrations salines plus faibles, ces symptômes étaient peu visibles à ce stade. Plus tard, après 6 jours de stress, alors que les plantes exposées à une solution saline de 150 mM étaient presque toutes mortes, on pouvait observer l'apparition, sur les plantes sauvages exposées à 100 mM de NaCl (Figure III.6.b), et à des degrés plus faibles sur celles exposées à 50 et 75 mM de NaCl (concentrations non illustrées), de la nécrose sur les pointes de la 3^{ème} feuille. Cette nécrose est décrite dans la littérature comme étant la manifestation de la composante ionique du stress salin (Lutts et al., 1996; Yeo and Flowers, 1983). Chez les mutants *aoc*, cette nécrose apparaît seulement sur la deuxième feuille (non illustrée). Il apparaît donc que le mutant *aoc*, comparé au sauvage, présente bien une meilleure tolérance au stress salin à une concentration de 100 mM (ou plus faible), qui produit des dommages après une incubation plus longue,

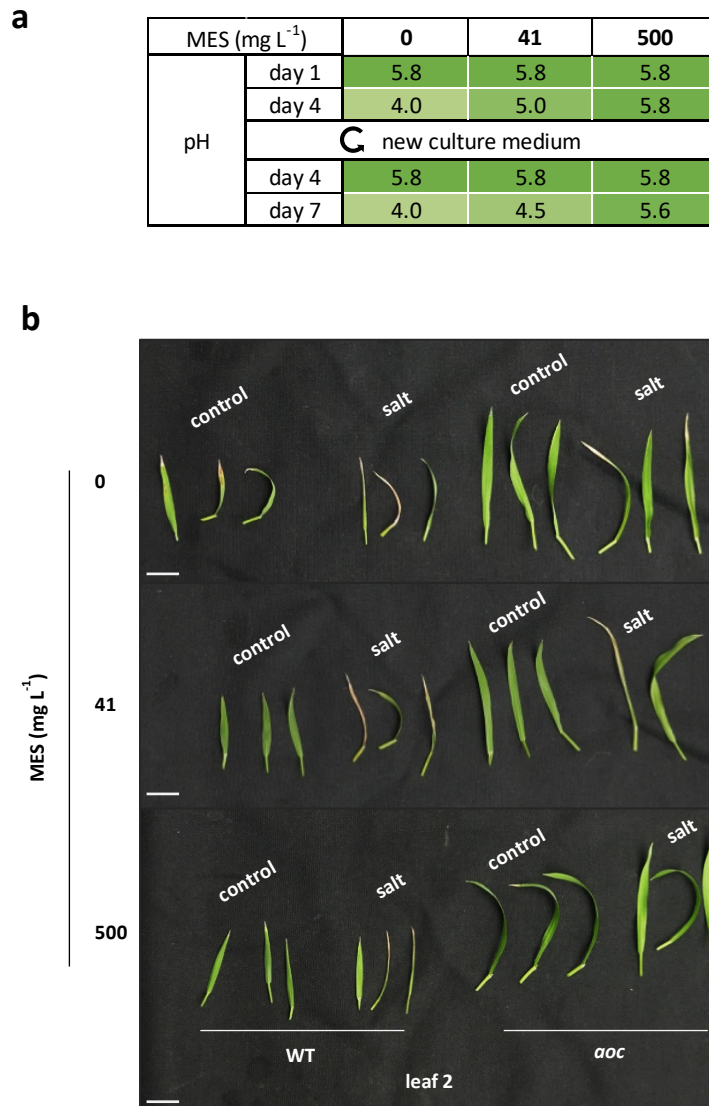


Figure III.7 : **Impact du pouvoir tampon du milieu de culture et de la stabilité du pH sur l'apparition de la nécrose sur les feuilles 2 des plantules WT et *aoc* exposées ou pas au stress salin.** Des plantules WT et *aoc* ont été cultivées en hydroponie pendant 11 jours avant d'être soumises au stress salin (100 mM NaCl) **a.** Les différentes concentrations de tampon MES (0 , 41, 500 mg L⁻¹) utilisées sur les trois expériences de stress salin conduites en parallèles. Le pH des différents milieux de culture est mesuré le premier et le quatrième jour après transfert des plantules sur le système hydroponique pour vérifier la stabilité du pH. Les milieux de culture sont renouvelés le quatrième jour puis le pH mesuré le jour-j et le septième jour. **b.** Photographie des feuilles 2 détachées de plantules WT et *aoc* soumises à 6 jours de stress salin. La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

entre 4 et 6 jours. Ces observations sont en accord avec plusieurs articles qui montrent une meilleure tolérance au sel lorsque le catabolisme de JA-Ile est accentué (Kurotani et al., 2015c, 2015b).

Après définition de la concentration saline à utiliser et de l'humidité relative optimale pour la croissance et l'application du stress salin, la dernière mise au point du protocole visait à réduire les symptômes nécrotiques induits indépendamment du stress salin. En effet, sur certaines plantes non exposées au sel, les feuilles les plus âgées peuvent présenter de légers symptômes de nécrose sur la pointe des feuilles, probablement dû à la baisse du pH du milieu au cours de la culture. Pour tenter de réduire cette nécrose non induite par le sel et faciliter la comparaison de la sensibilité des plantes WT et des mutants *aoc*, nous avons décidé de rajouter du tampon MES dans le milieu pour stabiliser le pH et voir son effet sur l'intégrité des feuilles. 2 concentrations de MES (500 mg L⁻¹ : concentration recommandée ; 41 mg L⁻¹ : concentration recommandée diluée 12x) ont été testées en comparaison avec un milieu de culture sans MES, correspondant à la condition de culture que nous utilisons par défaut (Figure III.7.a). Le pH des trois milieux de culture est fixé à 5,8 le jour du transfert des plantules sur le système hydroponique. Quatre jours plus tard, la mesure du pH a révélé une chute du pH à 4 dans le milieu de culture sans MES alors que celui contenant 41 mg L⁻¹ de MES est resté à 5. Le pH du milieu de culture contenant 500 mg L⁻¹ de MES reste toutefois inchangé. Les trois milieux de culture sont renouvelés le quatrième jour pour un suivi du pH trois jours plus tard. Au jour 7 du transfert des plantules sur le système hydroponique, on observe les mêmes chutes de pH qu'au jour 4, indiquant donc un fort pouvoir tampon du milieu de culture contenant 500 mg L⁻¹ de MES et un pouvoir tampon relativement moyen pour le milieu de culture contenant 41 mg L⁻¹ de MES. Lorsque ces trois milieux de cultures sont utilisés pour l'application du stress, on observe un réel effet de la stabilisation du pH sur l'intégrité des feuilles 2 des plantes puisque la nécrose non induite par le sel n'est apparente que sur la 2^{ème} feuille des plantes contrôles cultivées sans MES (Figure III.7.b). Sur la base de ces observations, nous avons décidé de travailler, pour la suite des travaux, avec un milieu de culture contenant 41 mg L⁻¹ de MES qu'on renouvellera tous les trois jours pour éviter un pH trop acide et les effets qu'il induit. Par ailleurs, l'humidité relative de l'environnement de culture des plantes est fixée à 60 % pour optimiser la croissance des plantes, et la concentration saline est fixée à 100 mM de NaCl pour réduire la composante osmotique et favoriser la mise en place de la composante ionique sur une période de 6 jours de stress salin. Ces donc sur la base de ces mises au point imprévues mais nécessaires que le protocole retenu a permis de réaliser toutes les expériences de stress salin faites en hydroponie, et d'obtenir des phénotypes reproductibles et robustes chez le cultivar Kitaake. Les principaux résultats obtenus sont présentés dans le manuscrit qui suit.

2. Manuscrit Ndecky et al. 2022

Jasmonate signaling controls negative and positive effectors of salt stress tolerance in rice

Simon Ndecky¹, Trang Hieu Nguyen², Elisabeth Eiche³, Valérie Cognat¹, David Pflieger¹, Nitin Pawar⁴, Ferdinand Betting⁵, Somidh Saha⁵, Antony Champion², Michael Riemann⁴ and Thierry Heitz^{1*}

1 Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

2 DIADE, Institut de Recherche et de Développement (IRD), Université de Montpellier, Montpellier, France

3 Institute for Applied Geosciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

4 Botanical Institute, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

5 Institute for Technology Assessment and Systems Analysis (ITAS), Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

***Correspondance**

Thierry Heitz, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

E-mail : thierry.heitz@ibmp-cnrs.unistra.fr

Running head: The jasmonate-dependent component of salt-stress response in rice

Funding information

SN was supported by an international doctoral fellowship from the Investissements d’Avenir (IdEx) program from Université de Strasbourg. RNAseq experiments were funded by a grant from Bayer Foundation to SN. The study benefited mobility grants from CampusFrance, DAAD (Germany) mobility funding and a grant from the European Campus (Eucor) program.

Abstract

Plant responses to salt exposure involve large reconfiguration of hormonal pathways that orchestrate physiological changes towards tolerance. Jasmonate (JA) hormones are essential to withstand various biotic and abiotic assaults, but their roles in salt tolerance are still debated. Here we describe the dynamics of JA metabolism and signaling in root and leaf of rice, a plant species that is highly exposed and sensitive to salt. Roots activate the JA pathway in an early pulse, while 2nd leaf displays a biphasic JA response with peaks at 1 hour and 3 days post-exposure. Based on higher salt tolerance of a rice JA-deficient mutant (*aoc*), we examined through kinetic transcriptome analysis the salt-triggered biological processes that are under JA control. Profound genotype-differential features emerged that could underlie observed phenotypes. ABA content and ABA-dependent water deprivation responses were impaired in *aoc* shoots. Moreover, *aoc* accumulated more Na⁺ in roots, and less in leaf, with reduced ion translocation correlating with root derepression of the *HAK4* Na⁺ transporter. Distinct reactive oxygen species scavengers were also stronger in *aoc* leaf, along with reduced senescence and chlorophyll catabolism markers. Collectively, the data identify contrasted contributions of JA signaling to different sectors of the salt stress response in rice.

Keywords: jasmonate, rice, salt stress, signaling, tolerance, transcriptome, transporter

Summary statement: We investigated through comparative transcriptome and physiological analysis the jasmonate-regulated components of the salt response in rice seedlings. JA signaling displays dual impacts: it is required for ABA and water deprivation responses but is detrimental to optimal sodium ion management.

1 | INTRODUCTION

Upcoming global climate perturbations are imposing more frequent stressful conditions to plants, including flood, drought, or extreme temperatures episodes. Soil salinization adds as an increasing limiting factor to crop productivity in coastal agricultural areas, causing growth retardation and yield losses. Rice (*Oryza sativa*), the major staple food crop for more than half of the world's population, is particularly exposed to stress and due to its uppermost importance for food security, has been established as a model species for monocotyledonous and cereal plants. As a semi-aquatic species partly cultivated in lowland, rice is increasingly exposed to salt contaminated water, urging the need to breed and disseminate more salt tolerant varieties. The physiological responses of rice to salt have been extensively analyzed and reviewed, based on the study of a wide variety of sensitive and tolerant cultivars and wild relatives (Isayenkov and Maathuis, 2019; Ismail and Horie, 2017; Julkowska and Testerink, 2015; Ponce et al., 2021; van Zelm et al., 2020; Yang and Guo, 2018).

Salt uptake and sensing by plant roots triggers rapid osmotic stress due to a reduction in water potential, followed by a slower ionic stress phase due to sodium toxicity in tissues (Yang and Guo, 2018). Early salt-induced responses include phospholipid signaling at the plasma membrane, initiation of specific calcium waves decoded by calcium-binding proteins and kinases followed by sodium channels activation like NHX7 involved in export of Na^+ out of the cell (van Zelm et al., 2020). Salt stress rapidly induces reactive oxygen species (ROS) in the apoplast through the activation of respiratory burst oxidase homologs (Rboh) and ROS act together with Ca^{2+} signaling to affect cellular pH and ion homeostasis (Hasanuzzaman et al., 2021). Ion distribution is orchestrated by multiple families of transporters whose members localize distinctly on the plasma membrane or endomembranes in cell specific patterns (Saddhe et al., 2021) to exclude or sequester Na^+ ions. Continuous Na^+ uptake perturbs K^+ homeostasis, nutrient acquisition and compromises efficiency of cellular processes including photosynthesis, while inducing cell wall modifications (Liu et al., 2021) and starch metabolism (Thalman and Santelia, 2017).

Immediate salt responses further transduce into the complex reconfiguration of hormone metabolism and signaling programs (Yu et al., 2020). Abscisic acid (ABA) is the dominant hormone that governs cellular and metabolic responses to drought or salt exposure (Sah et al., 2016; Vishwakarma et al., 2017). By promoting rapidly stomatal closure, ABA reduces evapotranspiration and controls overall water transport, in addition to modulating the expression of arrays of genes involved in the adaptation response, including starch degrading enzymes (Thalman and Santelia, 2017). Additionally, salt triggers a decrease in osmotic pressure and water loss, that is mostly compensated by the ABA-dependent accumulation of various osmolytes such as amino acids or sugar alcohols, and the induction of water deprivation responses.

More recent evidence indicates that several other plant hormones, acting in complex synergistic or antagonistic signaling cross-talks, impact salt responses and tolerance (Choudhary et al., 2021; Yu et al.,

2020). Jasmonates (JAs) act as essential mediators of defense programs to biotic attacks (Heitz, 2021), but have also been associated with responses to various forms of abiotic stress (Kazan, 2015). In the case of salt tolerance, contrasting results and conclusions have been reported using different experimental setups or plant species, so that JA functions under salt stress are still debated (Delgado et al., 2021; Riemann et al., 2015). External treatments with JA were shown to attenuate salt-induced damage in some species like wheat (Qiu et al., 2014) or barley (Walia et al., 2007), but in *Arabidopsis*, salt triggers JA-mediated root growth inhibition (Valenzuela et al., 2016) and external methyl-JA supply aggravates salt-triggered growth inhibition and senescence (Chen et al., 2017). Furthermore, in tomato, a JA-deficient line exhibited enhanced oxidative stress and associated damage relative to wild-type (Abouelsaad and Renault, 2018). However, in rice, a growing body of evidence suggests that endogenous JA accumulation and signaling is detrimental to salt tolerance, at least at the seedling stage. Salt-induced inhibition of rice seminal root growth is mediated by ethylene-jasmonate interaction (Zou et al., 2021). JA-deficient rice mutants *cpm2* and *hebiba* displayed less Na⁺ accumulation and increased ROS-scavenging activity in shoots, correlated with attenuated damage upon salt exposure (Hazman et al., 2015). Genes encoding catabolic enzymes acting on jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), the bioactive jasmonate hormone, have been identified in rice and are upregulated by salinity (Hazman et al., 2019). Interestingly, a rice activation-tagging line overexpressing CYP94C2b, a cytochrome P450 oxidizing JA-Ile, displays enhanced survival rate under salt conditions (Kurotani et al., 2015a). In addition, upon investigating a collection of extant rice accessions with various sensitivities, high salt-tolerance was found correlated with elevated expression of this gene (Kurotani et al., 2015b). Among the known physiological and molecular responses of rice to salt, very few have so far been linked to JA signaling. Rice Salt Sensitive 3 (RSS3) is a nuclear factor that interacts with JAZ repressors to modulate the expression of JA-responsive genes and root cell elongation during adaptation to salinity (Toda et al., 2013). Suppression or overexpression of JAZ9 antagonistically affects ion uptake with correlative impact on the expression of some ion transporter genes (Wu et al., 2015). Together, these data suggest that reduced JA-Ile accumulation and/or signaling ameliorates the capacity of rice to withstand salinity.

Multiple transcriptome comparisons between sensitive and tolerant rice varieties have been reported (Formentin et al., 2018; Kawasaki et al., 2001; Li et al., 2020; Mirdar Mansuri et al., 2019; Razzaque et al., 2017), but the peculiar biological processes and molecular targets regulated by JA signaling upon salt stress were not genetically addressed and remain largely unknown. In the present study, we compared the phenotypic, ionic, transcriptomic and some physiological characteristics of the Kitaake variety using the wild-type (WT) and a JA-deficient mutant interrupted in *ALLENE OXIDE CYCLASE* (*aoc*), an essential JA biosynthetic gene. Extensive genotype comparison of transcriptomes in roots and shoot allow to pinpoint particular biological processes that are under JA regulation. We establish that absence of JAs confers an apparent better salt tolerance phenotype in seedlings, based on a better regulation of Na⁺

distribution, and a delay in onset of senescence. However, JA deficiency substantially reduces the ABA content and water deprivation responses in leaf, resulting in impaired water management.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Plant culture and treatments

Oryza sativa L. ssp. japonica cv. Kitaake was used as WT and *aoc* as jasmonate deficient mutant (Nguyen et al., 2020). Jasmonate deficiency leading to male sterility, *aoc* homozygous seedlings were isolated from the progeny of AOC/*aoc* plants. For salt stress experiments, caryopses of a segregating population were first preciously rinsed, placed on Petri dishes containing water imbibed Whatman paper, then placed for 4 days at 28°C in complete darkness for germination. Skotomorphogenic development in JA-deficient mutants leads to very long mesocotyl allowing the isolation of the *aoc* homozygous mutants. WT and *aoc* seedlings were then transferred to a floating styrofoam for hydroponic culture (MS solution: 358 mg L⁻¹ basal MS buffered with MES 42 mg L⁻¹, pH 5.8) and incubated under continuous light of ~125 μmol m⁻² s⁻¹ at 28°C with 60% relative humidity. After 11 days growth, the MS solution was replaced by a saline solution (MS solution containing 100 mM NaCl) for the salt treatment and a new MS solution for the mock treatment.

For MeJA treatment, WT rice seeds were dehusked and surface-sterilized through successive baths in 70% ethanol (1 min), distilled water (1 min) and in a sodium hypochlorite solution containing ~3 % active chlorine (20 min) followed by 4 washing steps with distilled water under sterile conditions. Seeds were then sown in magenta boxes containing 0.4% phytoagar medium in MS as above and cultivated under same conditions as for the salt experiment. After 7 days, a cotton wick with 20 μL of pure MeJA was placed in each magenta box. All samples analyzed are constituted of a pool of tissues from three plants.

2.2 | Stomatal conductance and relative water content (RWC)

For stomatal conductance measurements, plants were raised in a hydroponic system as described above until the 5th leaves were fully expanded. Leaf stomatal conductance to water vapor (gsw) was measured with a LI-6800 portable photosynthesis system (LI-COR, Lincoln, NE) on the 5th leaf. Measurements were taken in an alternating manner from WT, mutant, control and stressed plants, respectively, from 1-7 h after day start (12 h days) to avoid bias imposed by the diurnal rhythm.

For RWC determination, leaf sheaths were collected from plants and immediately weighed to determine their fresh weight (FW). After 4 h hydration in plastic bags containing distilled water, the leaves were weighed again to measure the turgescence weight (TW). Then, leaves were dried for 24 h at 60° C and their dry weight (DW) was determined. RWC was calculated based on the following formula: RWC (%) = [(FW-DW) / (TW-DW)] x 100 described by Barr and Weatherley (1962).

2.3 | Electrolyte leakage

Leaf blades were harvested and quickly rinsed in distilled water to remove ions on the leaf surface. Leaves were then cut into small pieces (1-2 cm) and floated onto 15 ml distilled water in 50 mL tube. After 1 h gentle shaking at room temperature, water electrical conductivity of solution was determined to estimate ion leakage. Samples were then boiled for 30 min before cooling for 1 h to room temperature. Solution conductivity was re-measured to estimate the total released ions. Percentage of released ions from dead cells was calculated using the following formula: $[\text{conductivity at T0} / \text{conductivity of boiled samples}] \times 100$.

2.4 | Ion content measurement

Samples were ground frozen before being dried for 48 h at 60°C. Samples were digested using 0.5 mL ultrapure water, 2 mL HNO₃ (65% v/v, subboiled) and 0.5 mL H₂O₂ (30% v/v, p.a.) in closed digestion tubes (Gerhardt, UK) in a heating block (DigiPrep jr, S-prep) system at 110°C for 3 h. Samples were evaporated to near dryness and after cooling final volume of each sample was adjusted to 20 mL with 1% v/v HNO₃ (subboiled). To check for the quality, we included blank samples and different reference materials (NIST 1573a (Tomato leaves), NCS ZC' 73013 (Spinach), Spruce needles (ring test) into the digestion procedure. Potassium and sodium content in the digest were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, radial mode, iCap 7000, Thermo Fisher) in the Laboratory for Environmental and Raw Materials Analysis (LERA) at KIT. The accuracy of the reference material was in a good range with $\pm 5.9\%$ (K) and $\pm 7.1\%$ (Na) for the NIST 1573a, $\pm 3.2\%$ (K) and $\pm 3.52\%$ (Na) for the NCS ZC' 73013 and $\pm 8.7\%$ (K) for the spruce needles.

2.5 | Chlorophyll quantification

Frozen leaf samples were ground with glass beads (10 s, 5500 rpm, Precellys tissue homogenizer, Bertin Instruments, France) then homogenized with 80% cold acetone to extract chlorophylls (2 x 30 s, 5500 rpm). After sedimentation of cell debris by centrifugation, supernatant absorbance at 647 and 663 nm were measured to calculate the chlorophylls content based on the equations described in Porra et al. (1989).

2.6 | RNA extraction and gene expression analysis

Frozen roots were ground manually in a mortar and total RNA was isolated using RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Leaf samples were ground using the glass-bead homogenizer before RNA isolation using TRizol Reagent according to manufacturer instructions. For the purpose of RNAseq, total RNA integrity was controlled after DNase treatment using a Bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). RNA with RNA integrity Number (RIN) value above 6.2 were

used to construct cDNA libraries. Library construction and sequencing was performed at Novogene Europe (Cambridge, UK) on an Illumina platform (paired-end reads, 150 nucleotides). After exclusion of low-quality reads and reads with adaptors, clean reads were mapped to the reference genome *Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0* using HISAT2. The resulting read counts were processed through the DIANE pipeline (Cassan et al., 2021) for global normalization (EdgeR package), filtering of very low expressed genes (< 480 total read counts) and differential expression analysis (DeSeq2 R package) for which only genes with an absolute \log_2 Fold Change (\log_2FC) ≥ 1 and an FDR < 0.05 were considered as DEGs. GO enrichment analysis was performed with the PANTHER classification system (geneontology.org; Mi et al., 2019) and focused on biological processes enriched with an FDR < 0.01. The raw and normalized RNAseq data were submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus repository under accession GSE206706.

For RT-qPCR analysis, cDNA was synthesized with Superscript IV Reverse Transcriptase (Thermofisher) using 2 μ g of RNA. qPCR was performed using 20 ng of cDNA on a LightCycler 480 II instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) as described in Berr et al. (2010). The expression levels of the different targets were normalized against the expression level of the reference genes *UBQ5* (Os01g0328400) and *UBQ10* (Os02g0161900). The sequences of all primers used are listed in supplemental Table S4.

2.7 | Hydrogen peroxide staining

3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining was performed as described by Daudi and O'Brien (2012). Leaves of 5 days salt- and mock-treated rice seedling were collected, submerged in the DAB solution (1 mg mL⁻¹ DAB, 10 mM Na₂PO₄, 0.05% Tween). Since DAB is light sensitive, the preparation was covered with aluminum foil and incubated 4-5 h at room temperature under constant shaking (100 rpm). Leaves were then transferred to a clearing solution (ethanol/acetic acid/glycerol 3/1/1) and boiled for 20 min to bleach out the chlorophyll and reveal the H₂O₂ staining.

2.8 | Hormone profiling

Jasmonate/ABA profiling was performed as described in (Marquis et al., 2022)

2.9 | Statistical Analysis

All statistical analysis was performed on Excell. Comparisons of sample means were performed by student t-test. Significant differences of means were determined and represented using these following significant codes: “*”: P < 0.05; “**”: P < 0.01 and “***”: P < 0.001).

3 | RESULTS

3.1 | Jasmonate deficient *aoc* mutant displays reduced symptoms upon salt stress

The Kitaake variety of rice was chosen for its short life cycle and the availability of a mutant line obtained by CrisprCas9. This line bears a disruption of the single copy *ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC)* gene, encoding an essential activity for jasmonate biosynthesis (Nguyen et al., 2020). Homozygous *aoc* plants were selected from a segregating population based on skotomorphogenic development after 4 days germination in the dark (Riemann, 2020), and then transferred for hydroponic cultivation for 7 days before exposure of roots to control or salt-containing solution. Salt exposure resulted in shoot growth inhibition as expected in both genotypes (Figure S1a), but reduction of seminal root length observed in WT was absent in *aoc* (Figure S1b), in accordance with previous results (Zou et al., 2021). Among different concentrations of NaCl tested, 100 mM salt resulted in a differential tolerance phenotype visible 4 days after onset of stress, and that was reminiscent of the observations of Hazman et al. (2015) in the Nihonmasari cultivar. In WT Kitaake plants, the second (2nd) leaf first displayed severe symptoms of browning and drying starting from the leaf tip, whereas *aoc* 2nd leaf remained essentially symptom-free (Figure 1a). After longer times of incubation, the damage did eventually spread to leaf 3 or even 4, while maintaining the genotype differential phenotype. Electrolyte leakage was measured as a readout of tissue damage and was found reduced in *aoc* leaves 2 and 3 relative to their WT counterparts, confirming weaker disruption of tissue integrity in *aoc*.

3.2 | Salt stress triggers jasmonate metabolism with distinct patterns in rice roots and shoots

To investigate the time-resolved activation of jasmonate metabolism and signaling in WT plants, we collected separately root and 2nd leaf samples in a kinetic salt stress experiment, and submitted tissue extracts to quantitative jasmonate profiling by LC-MS/MS. Roots exhibited a rapid drop in their content in the JA precursor oxo-phytodienoic acid (OPDA) in response to salt, but JA levels remained stable throughout the experiment (Figure 2a). JA-Ile, the active hormonal compound, was only occasionally detected (at very low levels in some replicates) in the early time points, whereas more significant increases were recorded at 3 and 5 days of stress. The more stable JA-Ile catabolite 12COOH-JA-Ile was overaccumulated from 6 h and later on, indicating elevated metabolic flux through the JA-Ile pathway in salt-responding roots. In the second leaf, OPDA levels were low under control conditions and increased in a biphasic manner with an early peak between 1 and 6 h and a later one at 3-5 days post-salt exposure (Figure 2b), when visible tissue damage occurs. JA, JA-Ile and 12COOH-JA-Ile essentially followed similar dynamic trends than OPDA upon time, with 12COOH-JA-Ile being the highest accumulated compound. These results indicate the activation of complex jasmonate metabolism in rice seedlings in

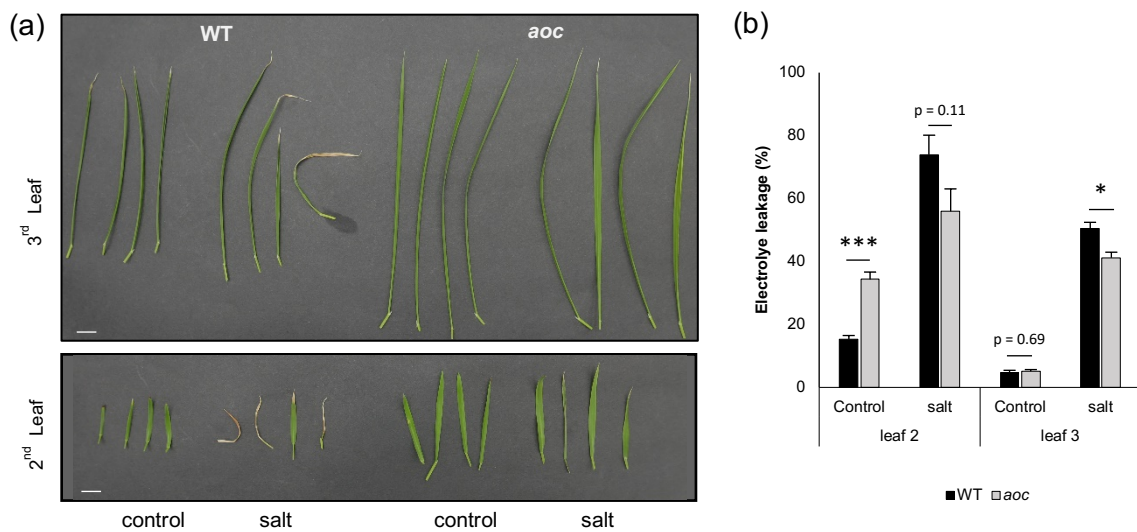


FIGURE 1. JA-deficient young rice plants exhibit milder symptoms than their wild-type (WT) counterparts. Seven-day old hydroponically-grown WT and *aoc* seedlings were exposed to either control or 100 mM NaCl (salt) solutions. After 5 days, representative second (2nd) and third (3rd) leaves were photographed (a). Scale bar: 1 cm. Second and 3rd leaves were detached from control and salt-exposed plants and submitted to electrolyte leakage assay. Histograms show means \pm SEM (n=5). Asterisks indicate a significant difference as determined by ANOVA plus Tukey's HSD tests (*P < 0.05).

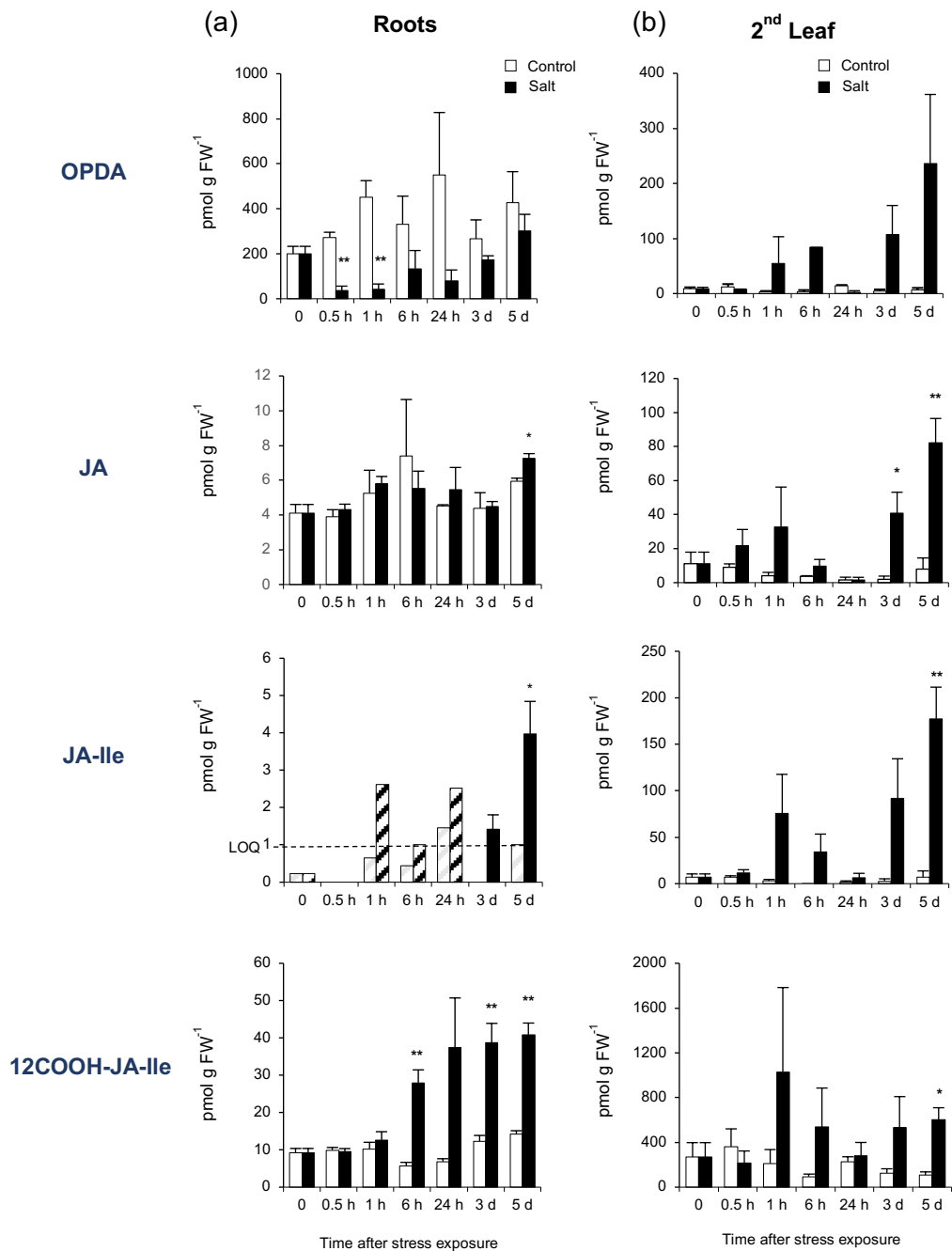


FIGURE 2. Kinetic analysis of jasmonate profile in rice seedlings submitted to 100 mM NaCl stress for 5 days. Seven-day old hydroponically-grown WT and *aoc* seedlings were exposed to either control (Control) or 100 mM NaCl (Salt) and sampled at the timepoints indicated. Roots (a) and second leaf (b) were collected separately and JAs were extracted and quantified. The precursor OPDA, JA, the bioactive hormone JA-Ile and its catabolite 12COOH-JA were quantified by LC-MS/MS and expressed as pmol g⁻¹ fresh weight (FW). Histograms represent the mean \pm SEM of three biological replicates. For JA-Ile, hatched bars indicate signal has been detected only in one replicate. Asterisks indicate a significant difference (ANOVA plus Tukey's HSD tests *P < 0.05; **P < 0.01). LOQ : limit of quantification.

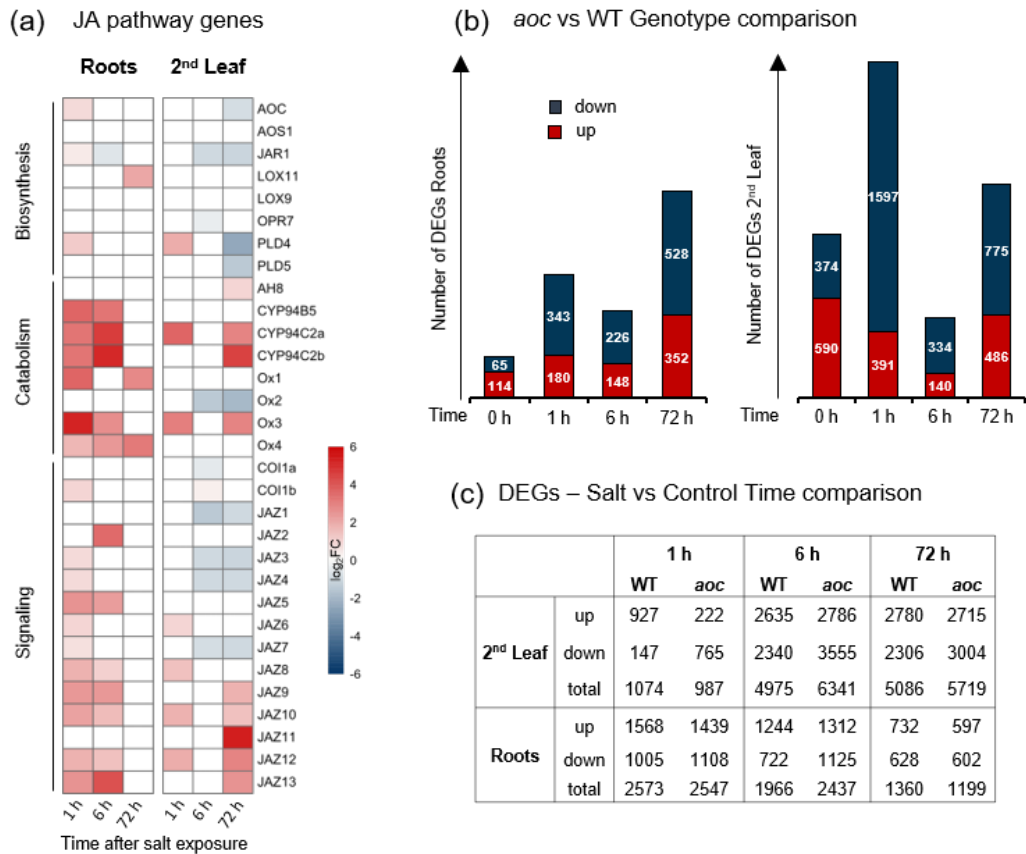


FIGURE 3. Transcriptome analysis of WT and *aoc* seedlings before and after salt stress. Plant samples generated as described in Figure 1 (three independent biological replicates) were used for RNA extraction and submitted to RNAseq analysis. Expression data (\log_2 fold change) of selected genes involved in jasmonate metabolism or signaling were extracted and plotted as a heatmap for roots and 2nd leaf (a). Differentially expressed genes ($-1 < \log_2 FC < 1$; $FDR < 0.05$) were filtered in both organs and displayed as histograms with numbers of down- and up-regulated genes displayed in genotype (b) or time comparisons (c).

response to salt stress, with organ-specific temporal patterns and individual compound abundances in roots and in 2nd leaf.

3.3 | Comparative analysis of differential transcriptome in WT and JA-deficient seedlings upon salt stress

To generate a global overview of the influence of jasmonate signaling on salt-triggered processes, we undertook a comparative transcriptome analysis in both roots and 2nd leaf of WT and *aoc* plants, in a kinetic study collecting samples at 0, 1 h, 6 h and 3 d after salt exposure. RNAseq was conducted, and the distribution of samples in a two-dimensional Principal Component Analysis (PCA) was established. Root and shoot samples were largely separated, illustrating their unique transcriptomes (Figure S2a). When datasets from each plant organ were processed separately, additional time dispersions were visible. In roots, 1 h and 6 h time points were well separated from 0 h and 72 h (Figure S2b), whereas in leaf, 1 h samples remained close to 0 h (Figure S2c). After normalizing the full dataset, we extracted from WT data the expression patterns of genes involved in JA metabolism and signaling (Table S1) relative to 0 h. This analysis revealed early upregulation of several genes at 1 and 6 h in roots such as those encoding JA-Ile catabolic CYP94 enzymes (Hazman et al., 2019) or JAZ proteins, and a biphasic induction in leaf at 1 h and 72 h (Figure 3a). These transcriptional behaviors closely mirror the distinct patterns of hormone/catabolite variations (Figure 2) and further illustrate that salt stress activates distinct JA signaling dynamics in below-ground and aerial parts of the plant.

We next determined differentially expressed genes (DEGs) within each organ, with respect to time and genotype comparisons, using a \log_2 Fold Change (\log_2FC) of $-1 < \log_2FC < 1$ and a false discovery rate (FDR) < 0.05 . We first found that before salt stress application, a significant number of DEGs (179 in roots, 964 in 2nd leaf) were apparent between *aoc* and WT (Figure 3b, 0 h). In time comparisons relative to their respective 0 h (Figure 3c), DEGs were most abundant at early (1 h and 6 h) time points after salt exposure in roots, whereas their rise in leaf occurred later at 6 h and 72 h (Figure 3c). In direct genotype comparisons (Figure 3b), except at 0 h, expression of a majority of DEGs were found reduced (labelled as down) in *aoc* mutant relative to WT at all time points. This suggests that jasmonate signaling contributes significantly to the massive gene expression switch under salt stress conditions.

3.3.1 | Transcription factor gene dynamics and JA-dependence

To globally estimate the extent of transcriptional changes that are under JA control, we set out to determine the dynamics of transcription factor (TFs) gene expression upon salt response, in particular with regards to their differential expression in both genotypes. Expression data were analyzed in time comparisons ($-1 < \log_2FC < 1$; FDR < 0.05), and organized as UpSet diagrams (Lex et al., 2014), that allow to intersect distinct expression patterns at one or several time points and visualize common or diverging

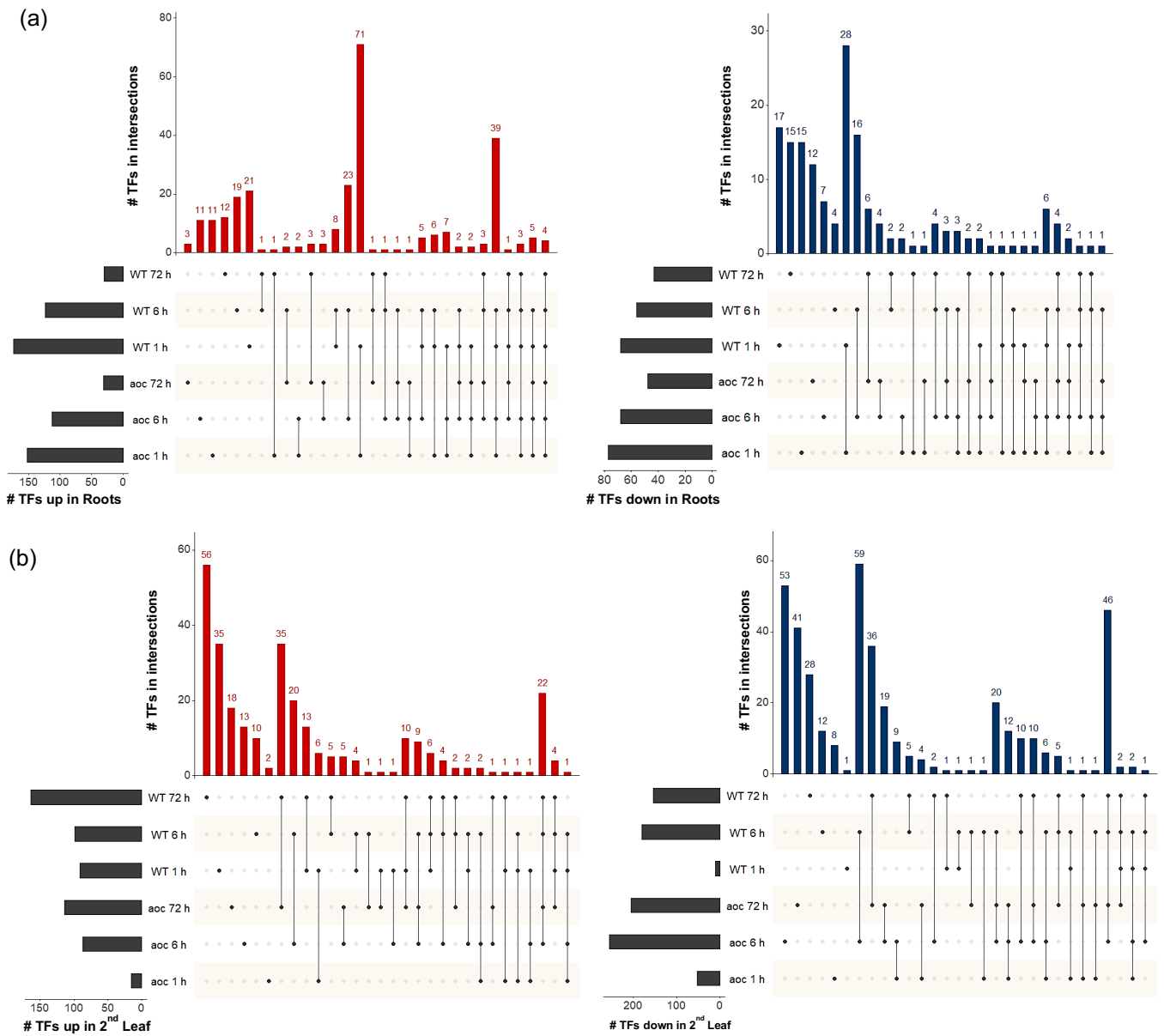


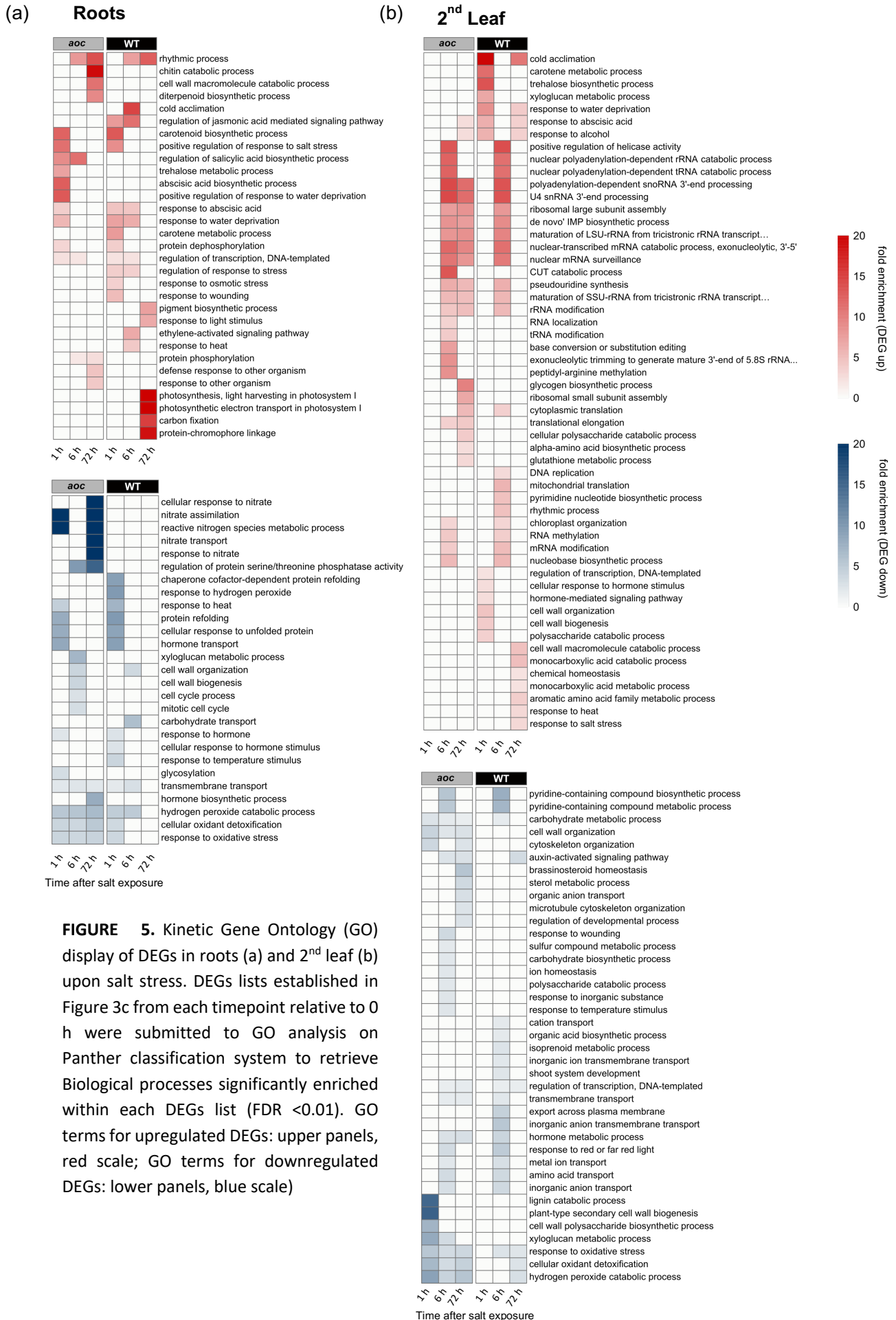
FIGURE 4. Comparative analysis of expression dynamics of genes encoding transcription factors (TFs) in WT and *aoc* roots (a) and 2nd leaf (b). Left panels: upregulated genes; right panels: downregulated genes. To screen for particular temporal behaviors, UpSet diagrams (Lex et al., 2014) were utilized to display shared and genotype specific expression at different time points following salt application. Numbers of differentially expressed TF genes ($-1 < \log_2 FC < 1$; FDR < 0.05) relative to 0 h are visualized as bars for individual (dots) or multiple (connected dots) time points.

behaviors in WT or *aoc*. In roots, both genotypes show about the same number of deregulated TFs at all time points after salt exposure, with the largest set of TF genes upregulated at 1 h, and their number then declined (Figure 4a left panel). Very few TFs were specifically responsive in *aoc* or WT (19 and 21 at 1 and 6 h in WT respectively) compared to those similarly deregulated in both genotypes after salt exposure (71 at 1h, 23 at 6 h and 39 at 1 and 6 h). In 2nd leaf, WT shows much more up-regulated TF genes at 1 h and 72 h than *aoc* and shows, in contrast, less down-regulated TF genes at all time points after salt exposure. These differences reflect particularly in large sets of TF genes specifically responsive in WT at 1 h (35 TFs) and 72 h (56 TFs) after salt exposure. This analysis indicates a significant influence of JA signaling on regulators of the leaf salt response, with mostly positive and few negative impacts of this hormone on TF gene expression.

As a case study, we next extracted the TF genes that are exclusively deregulated on one hand at 1 h and 6 h in WT root, and on the other hand at 1 h and 72 h in leaf, which are the materials where JA accumulation (Figure 2) and signaling (Figure 3a) was demonstrated. These genes are unresponsive in *aoc* and therefore likely to be activated in a JA-dependent manner and control JA-mediated processes. By doing so, we identified genes -mostly in leaf- that were previously associated to various extents with drought, dehydration, ABA, or abiotic stress responses but whose JA-dependence was largely unknown (Table 1). In addition, the filtering retrieved TF genes of the zinc finger, MYB, AP2, bHLH or WRKY

Organ	Gene ID	TFs name	TF family	Regulation	Stress-associated function	Reference (DOI)
2 nd Leaf	<i>Os08g0481400</i>	HOX20	HALZ	down	drought tolerance	
	<i>Os01g0738400</i>	C3H10	Zinc Finger	up	drought tolerance	10.3390/plants9101298
	<i>Os03g0264600</i>	-	-	up		
	<i>Os03g0820300</i>	ZFP182	Zinc Finger	up	salt tolerance	10.1016/j.bbexp.2007.02.006
	<i>Os05g0541400</i>	bHLH119/LF	bHLH	up		10.1093/mp/sss096
	<i>Os02g0764700</i>	ERF103	AP2	up	drought responsive	
	<i>Os06g0127100</i>	DREB1C	AP2	up		
	<i>Os08g0474000</i>	ERF104	AP2	up	drought responsive	
	<i>Os01g0859300</i>	ABI5/ABF1	bZIP_1	up	promotes salt sensitivity	10.1007/s11103-008-9298-4
	<i>Os01g0192300</i>	MYB1R1	Myb_DNA-binding	up		
	<i>Os01g0874300</i>	DLN31	Myb_DNA-binding	up		
	<i>Os02g0187700</i>	MYB1	Myb_DNA-binding	up		
	<i>Os02g0618400</i>	MPS	Myb_DNA-binding	up	cell wall remodelling	10.1111/tpj.12286
	<i>Os02g0462800</i>	WRKY42	WRKY	up	promotes leaf senescence	10.14348/molcells.2014.0128
Roots	<i>Os02g0654700</i>	ERF91/AP59	AP2	up	drought/salt tolerance	10.1104/pp.109.137554
	<i>Os09g0572000</i>	ERF87	AP2	up		
	<i>Os11g0168500</i>	ERF118	AP2	up		
	<i>Os01g0108600</i>	-	bHLH	up		
	<i>Os05g0163900</i>	bHLH036	HLH	up		
	<i>Os01g0274800</i>	CSA	Myb_DNA-binding	up		
	<i>Os01g0305900</i>	-	Myb_DNA-binding	up		
	<i>Os06g0649000</i>	WRKY28	WRKY	up	represses immune responses	10.1007/s11103-013-0032-5

TABLE 1 : List of transcription factor (TF) genes coregulated with JA pathway genes in rice salt stress response. Genes were selected from data in Figure 4 on the basis of their exclusive regulation in WT at 1 h and 6 h for roots, or 1 h and 72 h for shoot, and their absence of response in *aoc* ($-1 < \log_2FC < 1$; FDR < 0.05).



families that were not previously linked to JA-dependent salt responses. This finding suggests a significant contribution of JA signaling to the water deprivation component of salt stress. Additional TF expression intersections can be filtered from Table S2 to investigate specific dynamic behaviors.

3.3.2 | Gene ontology analysis reveals biological processes impacted by jasmonate signaling upon salt stress

To sort out the biological processes affected with regard to organ, time and genotype, general DEG lists were submitted to gene ontology (GO) analysis, and GO terms were displayed as kinetic heatmaps. Two types of comparisons were utilized to extract biological information: on the one hand, were plotted time comparisons with enrichment of terms in salt-exposed samples relative to 0 h of respective genotype (Figure 5), and on the other hand genotype comparisons where *aoc* and WT enrichments were directly compared at each time point (Figure S3). Major known JA-dependent responses including genes involved in defense to biotic stress or wounding, as well as many genes encoding JAZ repressors were enriched throughout the whole kinetic in WT leaf, meaning their loss in *aoc* (Figure S3c right panel), whereas such a differential pattern was only recorded at 1 h and 6 h in roots (Figure S3a). Before stress (0 h), specific behaviors emerged for oxidative stress- and cell wall-related genes. For example, 5 class III peroxidase genes were less expressed in *aoc* roots (Figure S4a), whereas in *aoc* leaf, nearly 20 peroxidase (Figure S4b) and 5 laccase genes were stronger expressed at 0 h, along with genes involved in secondary cell wall biogenesis, encoding cellulose synthases, expansins, pectin-methylesterases or hybrid prolin-rich proteins (HyPRPs) (for individual genes, see Table S3). This illustrates a significant and contrasted impact of JA signaling on the transcriptome under optimal conditions.

After exposure of roots to salt, numerous changes in GO term enrichment were recorded relative to non-stressed controls. Many of them had similar trends in the two genotypes, such as protein folding responses or response to heat that were shortly down at 1 h (Figure 5a bottom panel). Unexpectedly, several terms related to nitrate homeostasis, including *NRT* transporters and nitrate response genes, were downregulated at 72 h in *aoc* roots only. Among up-regulated terms, different terms related to ABA biosynthesis/responses, or water deprivation/osmotic responses showed various enrichment patterns: some transiently up in *aoc* at 1 h, related terms enriched only later in WT (Figure 5a, Table S3) (*see paragraph below*). Consistently, a number of known JA-regulated responses to biotic stress were enriched in WT (Figure S3a right panel). More surprisingly, several photosynthesis-related terms were found enriched in WT roots at 72 h only. This may result from the hydroponic culture that favors greening of roots (Figure S3b); however, expression magnitude of these genes remained marginal in roots compared to shoots. Conversely, several other terms were enriched at 72 h in *aoc* roots, such as some defense-related genes including several chitinases (also in ‘cell wall catabolic process’ term), *SUCROSE SYNTHASE 7*,

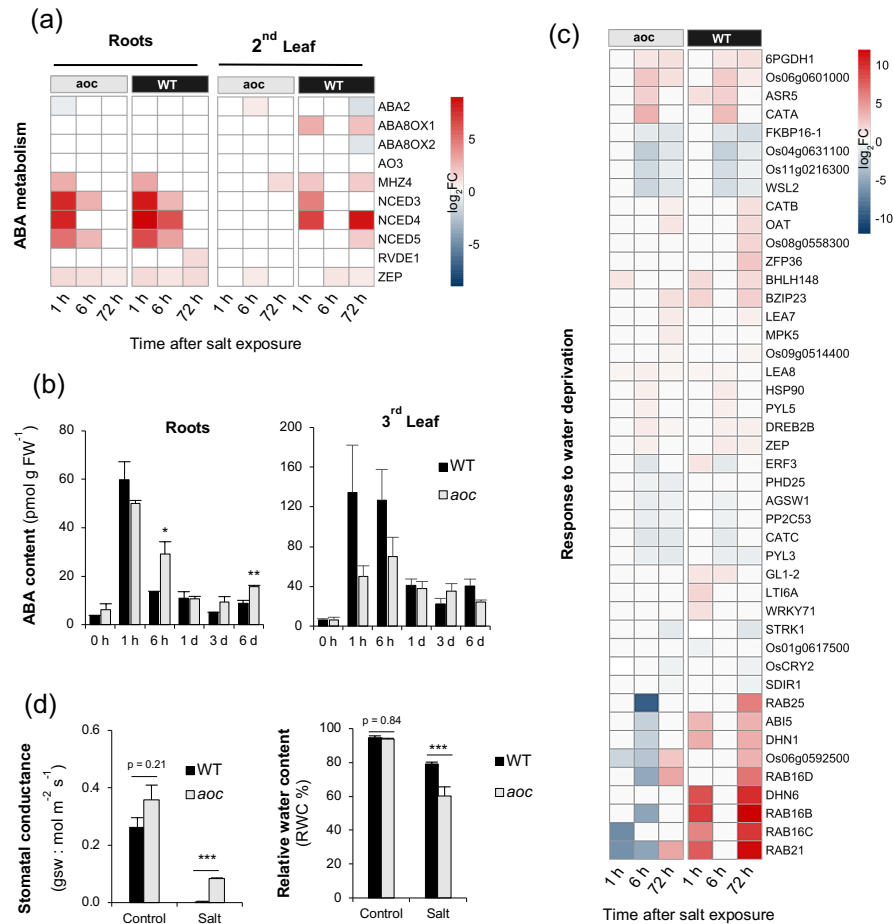


FIGURE 6. Analysis of ABA pathway genes, hormone content and water management responses upon salt stress in rice. Expression heatmap of described rice ABA metabolic genes is shown for *aoc* and WT roots and 2nd leaf (a). ABA content in roots and 3rd leaf. Histograms show mean of 3 independent biological replicates \pm SEM; *P < 0.05 (b). Expression heatmap of genes associated with GO term “response to water deprivation”. Only genes whose expression was changed at least at one time point in *aoc* or WT ($-1 < \log_2FC < 1$; FDR < 0.05) are represented (c). Stomatal conductance to water vapor (gs w) was determined in leaf 5 of WT and *aoc* plants (d, left panel). Relative water content (RWC) was determined in 3rd leaf of WT and *aoc* plants submitted to salt stress for 4 days (d; right panel). Histograms represent mean of 3 (gs w) or 4 (RWC) biological replicates \pm SEM. Asterisks indicate a significant difference (ANOVA plus Tukey’s HSD tests, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

and *SWEET* sugar transporters. These may represent JA-repressed components of carbohydrate metabolism and transport in roots.

The transcriptional landscape in 2nd leaf appeared largely different. Few (147) genes were downregulated by salt relative to 0 h at 1 h in WT, in contrast to *aoc* (765) (Figure 3c). In *aoc*, genes associated with lignin polymERization (7 laccases) dropped transiently. As well, most GO terms linked to cell wall biogenesis and oxidant detoxication, response to oxidative stress (mostly peroxidases) that were found enriched in *aoc* leaf at 0 h (Figure S3c left panel) were downregulated from 1 h to 72 h (Figure 5b bottom panel; Figure S4b). In addition, numerous terms related to water deprivation and ABA response were enriched in the up-response at 1 h and 72 h in WT but barely in *aoc*. These comprised for example genes encoding dehydrins, trehalose biosynthesis and cell wall biogenesis functions (Figure 4b right panel top, *see paragraph below*) and suggests that several processes are absent in *aoc* leaf at early time points of the salt response. In the genotype comparison, an enrichment in photosynthesis terms ('light harvesting, pigment biosynthesis process') in *aoc* is prominent (Figure S3c), indicating that the mutant may be prone to better maintain photosynthetic capacity under salt stress. At 6 h salt exposure, the response amplified in leaf, with a bulky group of terms that is shared between genotypes but with extended expression in *aoc*, and which relates to RNA processes, such as exosome complex components, mRNA surveillance and processing, and ribosome assembly (Figure 5b). This could be interpreted as a recovery response of the leaf to the initial rapid osmotic stress. Consistent with higher expression of photosynthesis components at 1 h, *aoc* leaves exhibited an enrichment in genes related to starch synthesis, recorded at 72 h (Figure 5b, top panel 'glycogen biosynthetic process'), which is reflective of a better energetic status of *aoc* leaf. A persistent anabolic activity is also illustrated by enrichment of primary cellular functions in *aoc* at 72 h such as protein translation or amino acid biosynthetic processes. This was accompanied by the upregulation of a large set of glutathione S-transferase genes at 72 h (Table S3).

The global analysis therefore revealed a significant impact of JA signaling, on root but more substantially on leaf transcriptome. Specific processes are altered in non-stressed conditions, but differential features were more prevalent upon salt stress, where JA deficiency seems to impair full induction of leaf ABA responses and oxidative stress related genes, and conversely allows for sustained maintenance of photosynthetic and carbohydrate storage components.

3.4 | JA signaling is required in leaves but not in roots for ABA biosynthesis and water deprivation management under salt stress

Given their genotype-specific GO term enrichment and importance in salt tolerance, ABA metabolism and water deficiency responses were further investigated. Genes encoding ABA biosynthetic or catabolic activities were examined, and their expression was found similarly salt-induced in roots of both genotypes (Figure 6a; Table S3). In contrast, their bi-phasic expression recorded at 1 h and 72 h in WT leaves, in

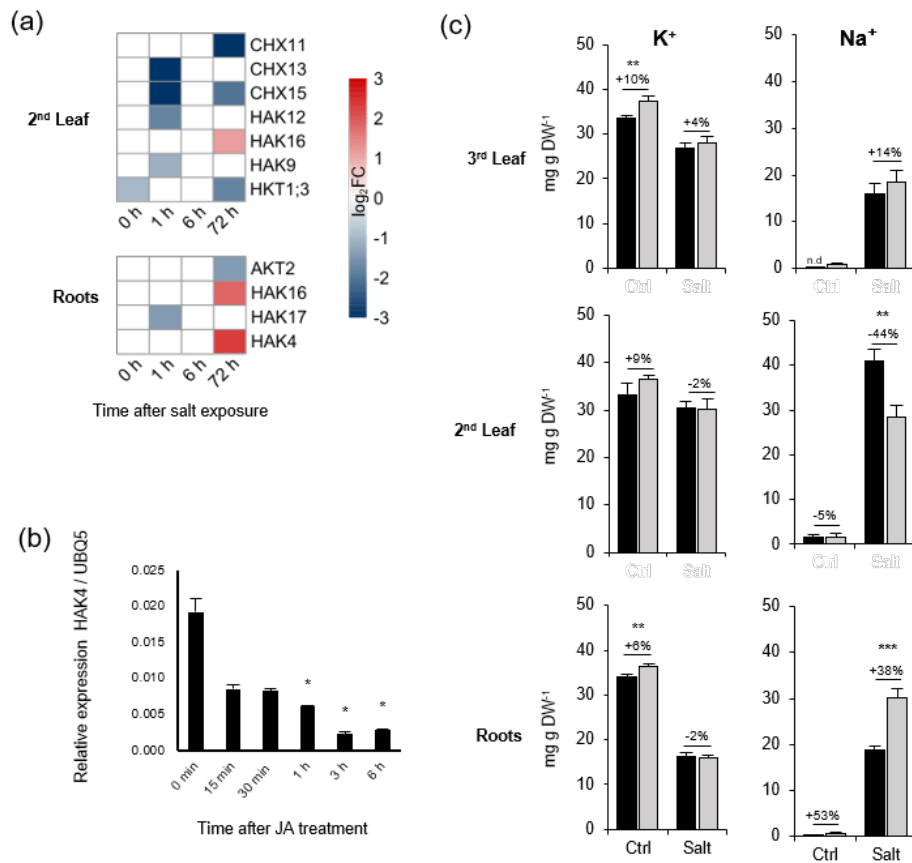


FIGURE 7. Analysis of differential ion transporter gene expression and ion accumulation in roots and leaves upon salt stress. Expression profiles of ion transporter genes in *aoc* vs WT are represented as kinetic heatmaps (a). Only transporter genes whose expression was changed at least at one time point in *aoc* or WT ($-1 < \log_2FC < 1$; FDR < 0.05) are represented. Expression of *HAK4* transporter gene in roots of WT plants exposed to MeJA. Data are taken from RiceXpro database (b). Quantification of Na⁺ and K⁺ ion accumulation in roots, 2nd and 3rd leaves: means \pm SEM from 6 independent biological replicates are represented (c). Asterisks indicate a significant difference (ANOVA plus Tukey's HSD tests, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

particular for the induction of the rate-limiting *NCED* genes in ABA biosynthesis, was lost in *aoc*. Consistently, ABA contents in both organs supported these distinct expression patterns. In roots, ABA levels peaked similarly at 1 h in WT and *aoc* and declined thereafter, whereas in leaf, ABA build-up was weaker in *aoc* compared to WT at 3 time points (Figure 6b). Concerning water deprivation response genes, that are largely under ABA control, their root response remained essentially unaffected by JA deficiency, but in leaf, two groups of genes with distinct behaviors were revealed: the largest group including a number of signaling genes encoding PYL (Pyrabactin resistance 1-like) receptors, TFs or a MAP kinase and behaved essentially similarly in *aoc* and WT (Figure 6c). This was in contrast with a smaller group of genes including *RAB* and *dehydrin* genes that were co-induced with JA pulses at 1 h and 72 h in WT, but were downregulated or unresponsive in *aoc*. Of note, expression of *OSCA1.1* (Os01g0534900), encoding a hyperosmolality-gated calcium channel (Zhai et al., 2021) was slightly reduced in both *aoc* organs (Table S3). Following our observation of accelerated rolling of *aoc* detached leaf material upon symptom imaging, we determined that stomatal conductance to water (gsw) dropped dramatically upon salt stress, but significantly less in *aoc* (Figure 6d). Consistently, relative water content (RWC) was found significantly reduced in *aoc* compared to WT upon salt stress (Figure 6d). Altogether, our results indicate that while the ABA transcriptional response remains largely functional in roots, in leaves, disrupted JA pathway prevents the full activation of ABA biosynthesis and optimal induction of osmotic stress/water deprivation responses, which in turn impinges on proper water management.

3.5 | JA signaling contributes to ion homeostasis and root-to-shoot sodium translocation

Sodium uptake by roots upon salt exposure imposes ionic stress throughout the plant that negatively affects cellular processes (Yang and Guo, 2018). Ion homeostasis that is maintained by various ion transporters is perturbed by Na^+ influx, and adaptation mechanisms are required, for example, to sequester Na^+ in vacuoles or exclude it from cells to lower cytoplasmic concentrations (Saddhe et al., 2021). Very little is known to which extent JA signaling is involved in modulating ion transporter gene expression, or how it impacts long-distance Na^+ transport. *OsJAZ9* misexpression was reported to modulate a few transporters (Wu et al., 2015), but no systematic analysis has been conducted so far. Individual ion transporters within multigene families have particular expression patterns and may encode distinct specificities, making it difficult to infer profiles from general GO analysis. We therefore undertook a more specific examination of JA impact on ion transporter expression by inspecting the profiles of about 70 rice genes (Table S1) that encode confirmed or putative Na^+ or K^+ transporters. Genes for which expression was differential in at least one-time comparison (Table S3) in either genotype ($-1 < \log\text{FC} < 1$, $\text{FDR} < 0.05$) were compiled in a heatmap. This retrieved 26 and 41 transporter genes from root and leaf analysis respectively (Figure S5). Contrasted expression patterns were revealed, with both down- and up-regulation of various members; most of these perturbations were comparable in parallel time-analysis of *aoc* and WT in roots and shoot, indicating that these regulations were largely JA-independent. When

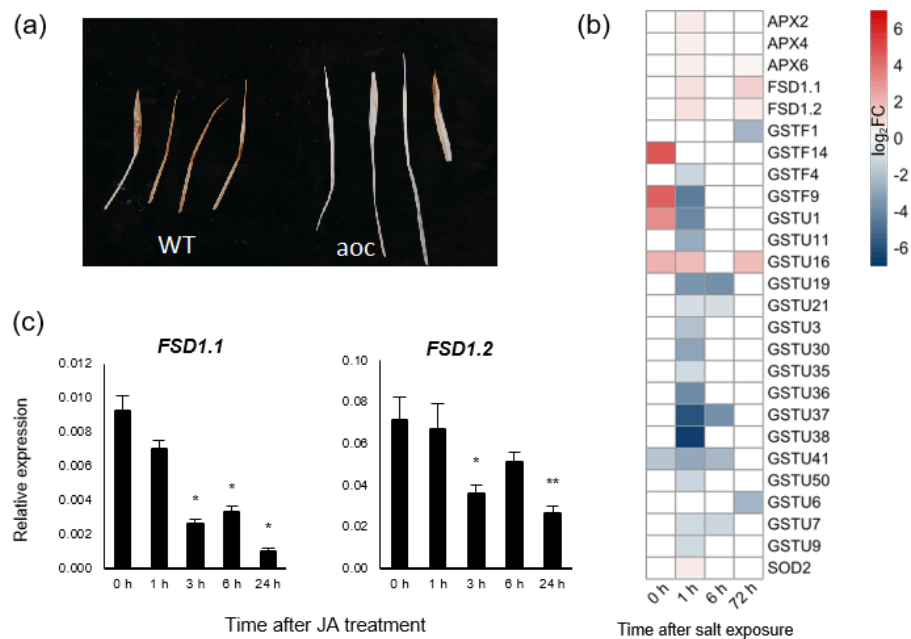


FIGURE 8. Analysis of reactive oxygen species-scavenging systems in leaves under salt stress. Second leaves of *aoc* or WT seedlings were submitted to DAB staining to visualize extent of H₂O₂ accumulation (a). Genotype comparison (*aoc* vs WT) of differentially-expressed genes encoding ROS-scavenging activities. APX : ascorbate peroxidase; FSD: iron-dependent superoxide dismutase; GST: glutathione S-transferase; SOD: superoxide dismutase. Expression of *FSD1.1* and *FSD1.2* in leaves of WT plants exposed to MeJA (c). Asterisks indicate a significant difference (ANOVA plus Tukey's HSD tests, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

expression was compared on a genotype basis at each time point, more specific features emerged: in 2nd leaf, most differentially expressed transporter genes were downregulated in *aoc*, including several members of the cation/proton exchanger family (CHX) of which some were associated positively or negatively to salt tolerance (Jia et al., 2021). In roots, two transporter genes were strongly differential: *HAK4* and *HAK16* were found significantly more expressed at 72 h in *aoc* roots relative to WT (Figure 7a and Figure S7b). *HAK16* is a plasma membrane-localized transporter involved in K⁺ uptake and translocation to shoots (Feng et al., 2019). *HAK16* belongs to cluster I of HAK transporters that are involved in K⁺ uptake and translocation to shoots (Feng et al., 2019; Véry et al., 2014). *HAK4* belongs to the cluster IV which groups HAK transporters closely related to PpHAK13, a Na⁺ permease identified in *Physcomitrium patens* (Véry et al., 2014). Specificity of the rice *HAK4* for Na⁺ rather than K⁺ transport has been recently confirmed in a report of *ZmHAK4* that was characterized in maize as conferring natural variation of shoot salt tolerance owing to its role in Na⁺ exclusion from xylem sap (Zhang et al., 2019). In the same study, the rice ortholog (*OsHAK4*) was found similarly expressed in the root stele and exhibited comparable ion transport properties. Consistent with its elevated expression in JA-deficient *aoc* roots, *OsHAK4* expression was progressively repressed in WT by external JA treatment experiment (Figure 7b).

To examine how such differential expression patterns of transporter genes relate to actual ion accumulation, we determined Na⁺ and K⁺ contents in roots and leaves before and 5 days after salt exposure. In our conditions, K⁺ content was not affected by JA deficiency (Figure 7c). In roots, salt exposure reduced K⁺ content by half with no JA-dependence, but salt had essentially no influence on K⁺ content in 2nd and 3rd leaves. Na⁺ content increased significantly to higher levels in *aoc* compared to WT roots upon stress. In contrast, Na⁺ accumulation was reduced by 44% in 2nd *aoc* leaf relative to WT whereas no difference was recorded in 3rd leaf. This indicates that higher *HAK4* expression levels correlate with enhanced Na⁺ retention in *aoc* roots and lower Na⁺ translocation to 2nd leaf, a relationship that could sustain the better salt tolerance of *aoc* leaf.

3.6 | JA signaling controls discrete ROS detoxifying genes

Salt stress comes along with oxidative stress whose degree of management is an important parameter affecting tissue survival (Hasanuzzaman et al., 2021; Liu et al., 2020). We previously analyzed the activity of the enzymatic ROS in *cpm2* and *hebiba* mutant lines in leaves at 72 h post salt exposure and found that total glutathione S-transferase (GST), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) activities were elevated in JA-deficient leaves compared to WT (Hazman et al., 2015). Similar to the Nihonmasari cultivar used in that study, here DAB staining of reactive oxygen species (ROS) in Kitaake 2nd leaf visualized stronger signal in WT relative to *aoc* in response to salt, confirming reduced H₂O₂ accumulation in absence of JAs (Figure 8a). Concerning transcriptome data, we screened the behavior of nearly 200

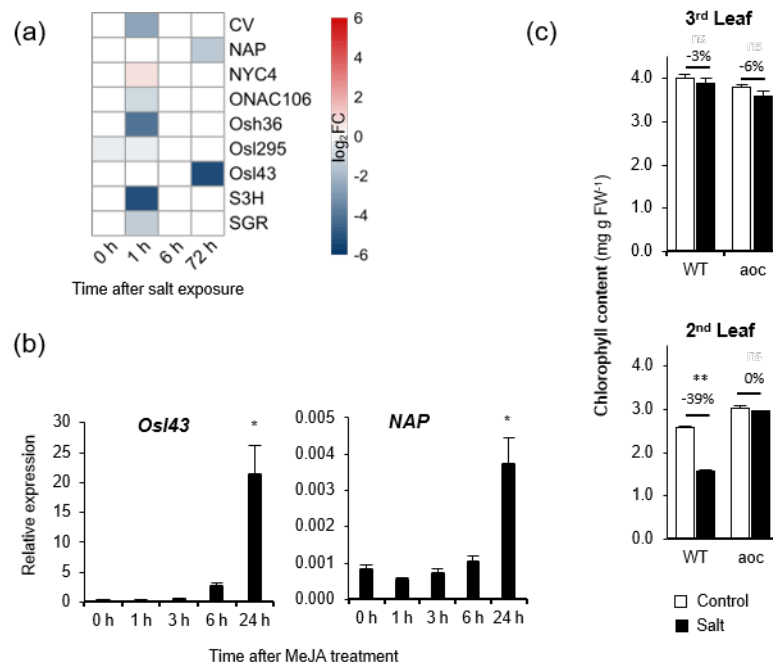


FIGURE 9. Jasmonate deficiency delays induction of senescence-promoting genes upon salt stress. Expression of genes associated with senescence (SAGs) was compared in 2nd leaf between *aoc* and WT genotypes at four time points and genes whose expression was changed at least at one time point in either genotype ($-1 < \log_2FC < 1$; $FDR < 0.05$) are represented as a kinetic heatmap (a). Expression of *Osl43* and *OsNAP*, two SAGs that are strongly differential in (a), was monitored upon response to MeJA exposure (b). Histograms display means \pm SEM from 3 biological replicates. Chlorophyll contents was determined in WT and *aoc* 2nd or 3rd leaves after 4 days of salt stress. Asterisks indicate a significant difference in means (ANOVA plus Tukey's HSD tests, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

genes (Table S1) encoding ROS-scavenging or -consuming activities, including ascorbate (APX) and class III peroxidases, catalases, GST, POD, RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homologues) and SOD. A majority of salt-triggered changes appeared similar in both genotypes, and are thus largely JA-independent (Figure S6a). Several *GST* genes appeared however less stimulated, or downregulated by salt in *aoc*, indicating a partial JA-dependence. The genotype comparison highlighted several *GST* genes that were more expressed in *aoc* leaves at 0 h (along with many POD genes, see Figure S4b), possibly protecting tissues even in non-salty conditions, but only *GSTU16* remained upregulated at 72 h in *aoc* (Figure 8b). In addition, this comparison disclosed the sustained expression in *aoc* leaf of three *SOD* genes: the Cu/Zn-dependent *SOD2* at 1 h, and *FSD1.1* and *FSD1.2*, encoding Fe-dependent chloroplastic SODs. Normalized counts of these candidate targets are plotted in Figure S7a and illustrate lower expression in WT. FSD activity may sustain stronger superoxide dismutation into less toxic hydrogen peroxide in sodium-challenged chloroplasts and alleviate salt-induced damage. Consistently, exogenous JA treatment repressed *FSD* expression in WT plants, confirming their negative regulation by JA signaling (Figure 8c). Altogether, JA deficiency better maintains or derepresses specific genes that could underlie the amelioration of distinct ROS scavenging activities.

3.7 | JA deficiency delays salt-induced senescence and chlorophyll degradation

Salt intoxication along with oxidative stress are known to result in accelerated leaf senescence (Figure 1) involving mainly ABA-mediated responses, but the specific contribution of JA signaling is less characterized (Lee and Masclaux-Daubresse, 2021). We therefore examined 27 rice genes (Table S1), annotated as Senescence Associated (SAG), for their transcriptional behavior in leaf. Many SAGs were salt-induced in WT, particularly at 72 h (Figure S6b), including those encoding known transcription factors acting as positive regulators of senescence, such as *ERF101* (Lim et al., 2020) or *NAP* (Liang et al., 2014). Both time- (Figure S6b) and genotype-comparisons (Figure 9a) showed that their expression was lower in *aoc* leaf, in terms of intensity or timeframe, along with reduced expression of senescence execution genes such as *Chloroplast vesiculation CV* (Sade et al., 2018), chlorophyll degrading genes including *SGR* (*StayGreen*) or *NYC1* (*Non-Yellow Coloring 1*), consistent with the phenotypically delayed senescence in *aoc*. Furthermore, the SAGs *OsI43* and *NAP* were confirmed to be JA-inducible upon exogenous treatment (Figure 9b). The impaired induction of genes promoting chlorophyll degradation is consistent with the stress-resilient expression of chlorophyll and other pigment biosynthesis genes in *aoc* leaf when this declines in WT (Figure S3c). Consistently, *VTE3* (*VITAMIN E DEFICIENT 3*), encoding a methyltransferase (Os07g0179300) in the biosynthesis of the chloroplastic antioxidant α -tocopherol (Muñoz and Munné-Bosch, 2019) was higher expressed in *aoc* leaf in control and early stages of the response (Table S3). Inhibition of senescence-associated catabolic processes in *aoc* leaves was supported by the stability of chlorophyll content under salt stress (Figure 9c). In contrast, WT damaged 2nd leaf reduced by 39% its chlorophyll content while content remained stable in 3rd leaves that were symptomless

in this experiment. These differential expression data provide a molecular basis for a delayed salt-induced senescence in JA-deficient rice.

4 | DISCUSSION

Plant exposure to excessive salt affects a myriad of biological processes and triggers complex adaptive changes to maintain physiological functions sustaining growth and reproduction. Responses to salt stress have been extensively addressed in numerous model and non-model plant species at the physiological, cellular and molecular levels, and a number of tolerance-associated genes have been identified (Arif et al., 2020; Ponce et al., 2021; van Zelm et al., 2020; Yang and Guo, 2018). Central to adaptation responses, hormonal interactions orchestrate complex reconfigurations (Choudhary et al., 2021; Yu et al., 2020). Most hormonal pathways are perturbed upon plant exposure to salt, typically abscisic acid is increased and directs many beneficial responses, but negative effects on tolerance have also been reported as for cytokinins or ethylene (Yang et al., 2015). Jasmonate roles in immunity against biotic stress are well documented and positive impacts in adaptation to some abiotic stresses such as cold or drought are being consolidated (Kazan, 2015; Marquis et al., 2022; Riemann et al., 2015). In contrast, understanding JA functions in salt tolerance is still blurred by some contradictory data between exogenous JA application - which may ameliorate tolerance-, and genetic data in rice from either JA biosynthetic mutants (Hazman et al., 2015) or high catabolic lines (Kurotani et al., 2015a; Kurotani et al., 2015b), which suggest detrimental impacts of JA on salt tolerance. To solve this paradox, a side-by-side kinetic comparison was undertaken between a recently-established mutant that is fully devoid of JAs (Nguyen et al., 2020) and its wild-type in the rapidly-growing cultivar Kitaake. Here, the goal was not to exhaustively describe transcriptional changes triggered by salt, that are widely documented in rice (Formentin et al., 2018; Kong et al., 2019; Li et al., 2020; Zhang et al., 2022), but rather to map biological processes -and when possible individual genes- whose activity are significantly different in presence or in absence of a functional JA biosynthetic pathway.

We chose to analyze simultaneously roots and first emerged leaves (2nd and 3rd) as salt is sensed first in roots and tissue damage was recorded primarily in leaf, and also because whole plant Na⁺ management is critical to tolerance. Under the conditions used, a clear differential phenotype was obtained with WT 2nd leaf undergoing extensive damage from day 4-5 while *aoc* remained essentially symptomless, a trend that later extends to new emerging leaves. These observations are in accordance with a previous report in Nihonmasari cultivar (Hazman et al., 2015) and confirm that interrupted JA biosynthesis mitigates damage in rice response to salt at the seedling stage. They further suggest that some JA-controlled processes end up in suboptimal resilience to salt.

To establish a comprehensive picture of jasmonate accumulation dynamics upon salt stress, detailed hormone profiling was performed in WT rice plants, revealing distinct patterns in each organ (Figure 2).

In roots, early consumption of pre-existing precursor OPDA seemed to be at the basis of JA-Ile synthesis and catabolism with low amplitude. In 2nd leaf, all four analyzed compounds exhibited bi-phasic accumulation by 1 h and later by 3-5 days, the late increase being concomitant to leaf symptom appearance. The rapid pulses recorded here were frequently missed in previous studies. These hormonal patterns were consistently matched by JA pathway gene expression dynamics and together, the data highlight the organ-specific timeframes of activation of JA metabolism and signaling: within the first hours of salt exposure in roots, whereas the leaf response expresses as an immediate pulse by 1 h followed by a longer lasting activation starting by day 3. It is tempting to interpret that the early JAs accumulation may be due to the rapid osmotic stress component of salt exposure, and the second wave to consequences of the slower Na⁺ accumulation in tissues.

Differential expression (DEGs) was mined for each organ in two dimensions: time-resolved comparisons allowed to assess dynamics relative to untreated controls, but such readouts are impacted by expression at 0 h which may vary in *aoc* and WT. Data were thus also compared directly between genotypes at each time point. Overall, DEGs number was highest at 1 and 6 h in roots and more delayed in leaf, reflecting long-distance spread of signaling. TF genes could be readily filtered for peculiar behaviors throughout the kinetic. For example, a number of TFs regulated only in WT were identified, and are thus JA-dependent; a few have previously been associated with drought or ABA responses, but others are of unknown function. In a global investigation, DEG lists were submitted to GO term enrichment analysis, of which only the most prominent outcomes can be discussed here. The study should be taken as a resource paper that can be mined for many more processes than could be addressed presently. For example, many cell wall-related terms were perturbed by JA-deficiency in various ways before or after stress. The constitutive upregulation of expansins or HyPRPs in *aoc* leaf relates to two recent findings: ectopic overexpression of *EXP7* increases salt tolerance by promoting antioxidant activity, cell elongation and ion homeostasis (Jadamba et al., 2020); as well, HyPRP06 regulates salt tolerance via apoplastic ROS homeostasis (Zhao et al., 2022). By extension, the elevated expression of many class III peroxidases in *aoc* leaf may alter the redox status of the apoplast and facilitate cell wall integrity maintenance under salt (Liu et al., 2021).

At least four major differential features emerged from the comparative transcriptome analysis, even though additional processes in the dataset deserve attention in the future:

1/ The ABA pathway, whose activation is essential to the rapid response to abiotic stresses (Raghavendra et al., 2010), was selectively impaired in JA-deficient *aoc* mutant. Global assessment indicated an enrichment in ABA-related GO terms in WT leaves, meaning their under-representation in *aoc*. Upon closer examination, a contrasted picture emerged: while only a few ABA-induced targets, including the TF *ZFP36* controlling antioxidant defense (Zhang et al., 2014) were depressed in *aoc* roots, their ABA content was not different from WT (Figure 6). Conversely, ABA biosynthetic gene expression and ABA

hormone build-up were much lower in the early phase of the response in *aoc* leaf, correlated with a strongly reduced expression of some -but not all- targets such as several *RAB* or *DHN* genes. This impaired ABA response was reflected physiologically by an incomplete drop in stomatal conductance in *aoc* leaf in response to salt, resulting in a reduced water content due to excessive transpiration in these tissues. The importance of ABA-JA interactions under drought was recognized previously in Arabidopsis (de Ollas and Dodd, 2016). Our findings demonstrate that the proper deployment of the water deprivation response as part of the salt stress syndrome in rice leaves relies on a positive ABA-JA crosstalk, at least for a peculiar sub-branch of the response. They also coincide with the independent observation that JA signaling is required in rice to withstand polyethylene glycol-induced osmotic stress (Tang et al., 2020).

2/ A second major aspect affecting salt tolerance is linked to variations in management of Na^+ that floods the successive cell layers. Global expression survey illustrated the very diverse expression changes of ion transporters, even within a given gene family. Probably various subcellular, cellular, tissue and organ-specific ion transporters show distinct reactivities to the massive influx of Na^+ . Most of these dynamics, irrespective of their importance under normal or stress conditions, were found unaffected by the status of JA signaling (Figure S5). Because Na^+ management and tissue content are critical parameters for salt tolerance (Ganie et al., 2021; Ponce et al., 2021), and JA-deficient rice mutants were reported to accumulate less Na^+ in leaves (Hazman et al., 2015), we sought to identify candidate ion transporter genes that were impacted by JA signaling and that could account for differential Na^+ homeostasis in *aoc*. By filtering through the genotype comparison, a low number of *aoc* leaf-downregulated genes popped-up from the CHX and HAK families (Figure 7) and could be at the basis of distorted ion homeostasis. More specifically, *HAK4* and *HAK16* displayed stronger expression in *aoc* roots. *HAK16* functions in K^+ uptake and translocation to shoots, maintaining potassium homeostasis and salt tolerance (Feng et al., 2019). *HAK4* was only recently characterized as a root transporter in rice and in maize where it confers natural variation of salt tolerance. In both species, it is believed to exclude Na^+ from xylem sap (Zhang et al., 2019). Here, its upregulation in rice *aoc* roots, indicative of a JA-repression in WT, is fully consistent with more Na^+ being retained in *aoc* roots and less being translocated to shoots (Figure 7), possibly contributing to attenuate leaf damage. This result constitutes a rational basis to investigate genetically the function of *OSHAK4* in the JA-dependent control of root-to-shoot Na^+ translocation.

3/ ROS production and subsequent activation of detoxication systems are integral to the build-up of salt stress. JA deficiency resulted in genotype differential expression of a number of genes encoding ROS-metabolizing activities or affecting redox status. A large number of genes encoding apoplastic H_2O_2 -consuming class III peroxidases were stronger expressed in non-stressed *aoc* leaf, which may contribute to lower resting ROS levels and better buffering of subsequent salt-induced ROS burst. More specifically, a repression by JA signaling in WT of the Fe-dependent *FSDI.1* and *FSDI.2* was uncovered and point to

a better superoxide ion scavenging in chloroplasts of *aoc* leaves (Figure 8). This reinforces chloroplasts as important sites for cell death initiation under salt stress in rice (Ambastha et al., 2017).

4/ More directly linked to the visual leaf damage phenotype are the processes related to senescence. While the developmental senescence-promoting activity of JAs along with other stress hormones including ABA and ethylene is well-described (Wojciechowska et al., 2018), the extent to which JA signaling activates salt-induced senescence pathways was largely unknown. Here, the combined analysis of SAG expression, leaf tissue integrity and chlorophyll content establishes that JA signaling is a major mediator for the execution of senescence processes under salt stress in rice. Suppressing JA biosynthesis in *aoc* impaired or delayed most of these programs, resulting in extended viability of vegetative tissue. This is in full accordance with the delayed salt-induced senescence observed in a rice line overexpressing a JA-Ile catabolic gene (Kurotani et al., 2015a). The partial impairment of ABA signaling in *aoc* leaves could also be at the basis of delayed senescence.

In conclusion, the extensive transcriptome and physiological analysis performed in this study have disentangled some of the contradictory results reported as to negative or positive impact of JA signaling on salt tolerance (Figure 10). Salt concentrations and timing applied are important parameters as to the relative strengths and dynamics of osmotic and ionic components of the stress. We demonstrate that JA is required for ABA to co-regulate positively responses limiting water loss and that JA signaling triggers several pathways leading to leaf senescence. The JA-regulated biological processes that we identified are likely coordinated and converge to accelerate tissue damage. Within cell wall-related perturbations, some JA-dependent upregulated pectin methyl esterases in WT could trigger a reported MeOH-JA cascade that promotes senescence (Fang et al., 2016). Conversely in *aoc*, increased expression of *HAK4*, a transporter gene under negative JA regulation, correlates with higher Na^+ retention in roots, protecting leaves where less toxic Na^+ is accumulated, senescence machinery remains silent, along with increased ROS scavenging capacity in chloroplasts. These different physiological features are in accordance with similar traits recorded in a recent study with JA-defective maize seedlings (Ahmad et al., 2019). The present transcriptome dataset needs to be further explored to decipher the deeper consequences of JA signaling onto responses to salt; as an example mineral nutrition would be an important target to follow throughout the plant's lifecycle. With such dual impacts, JA signaling cannot be associated strictly anymore to either salt sensitivity or tolerance.

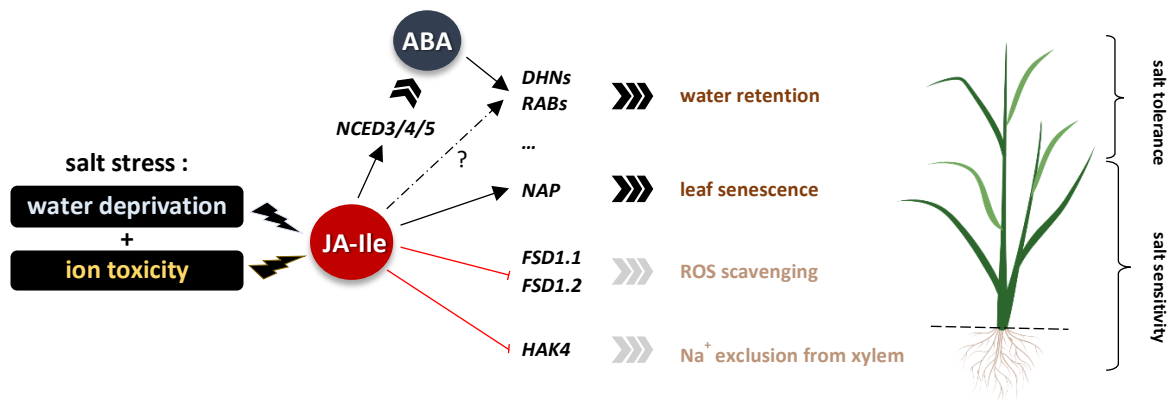


FIGURE 10. Proposed model of JAs-regulated functions in the rice response to salt stress. Salt stress through its osmotic and ionic components stimulates JAs biosynthesis which leads to transcriptional changes of numerous gene targets. This work highlights newly-defined JAs targets whose respective functions allow to reconsider the specific impact of JA signaling in the physiological regulation of the salinity stress response. On one hand, JA signaling is critical for full induction of ABA biosynthetic genes to boost ABA accumulation. Both hormones, likely in synergy, activate particular ABA-regulated responses including dehydrins and RAB genes to ameliorate water deprivation responses. JA is also required for stomatal function to limit water loss in rice leaves. On the other hand, JA signaling, through transcriptional repression of *HAK4* in roots and *FSD* genes in leaves, impairs Na⁺ exclusion from xylem and ROS detoxification in leaves respectively, which aggravates Na⁺ toxicity in photosynthetic tissues. This set of responses, associated to the induction by JAs of *NAP*, a transcriptional activator of leaf senescence, can explain the severe necrotic symptoms observed in WT leaves after salt stress. Globally our data establish JAs as major regulators of the rice salt stress response in which JA signaling can't anymore be uniformly associated with salt sensitivity or tolerance. JA signaling controls complex responses in different organs whose final outcomes depend on the characteristics of the salt stress episode. Flash symbols illustrate the stimulation of JA biosynthesis and signaling by salt stress; black arrows and red lines indicate respectively transcriptional activation and repression of JA-target genes; compiled "greater than" symbols indicate positive regulation of key pathways involved in rice salt stress response.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Malherbe, C. Kotschenreuther, and J. Wagner for technical assistance, and A. Soriano for advices in early transcriptome analysis with DIANE pipeline. We are grateful to J. Zumsteg for technical help in LC-MS/MS analysis and A. Berr for access to conductimeter.

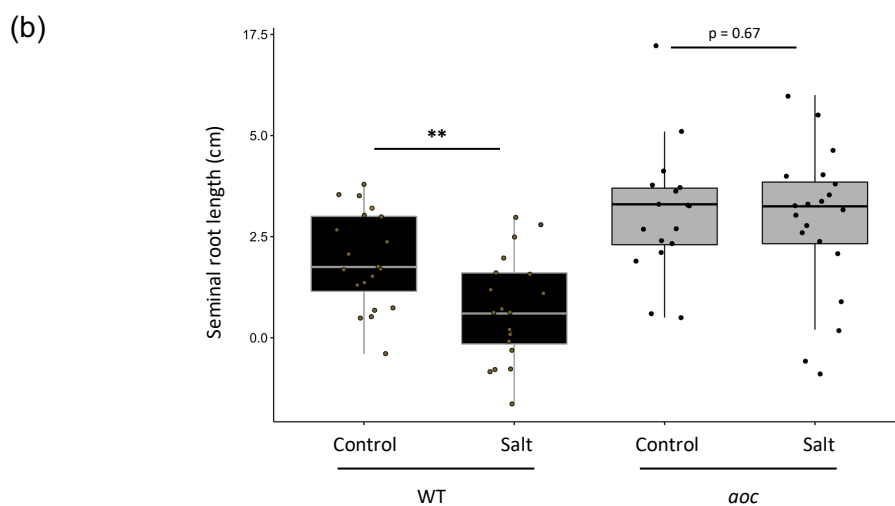
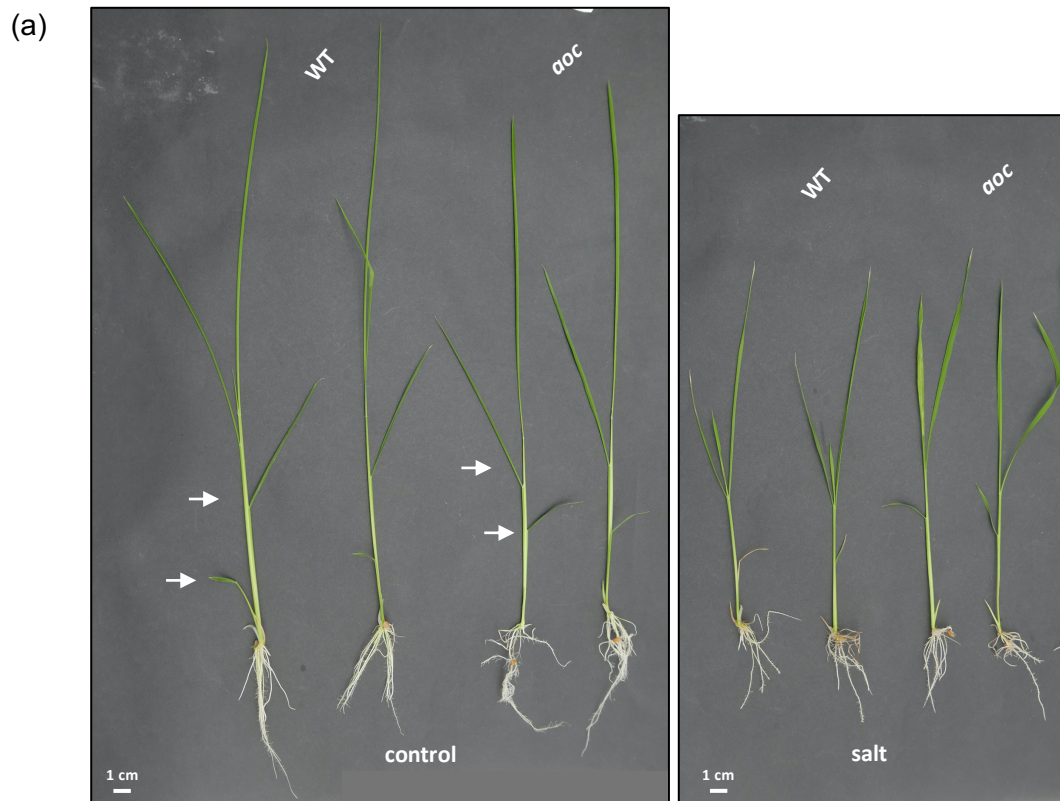
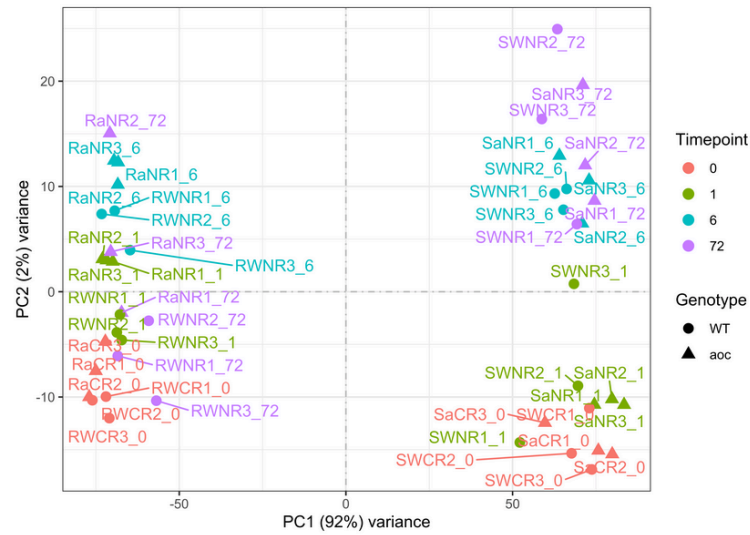
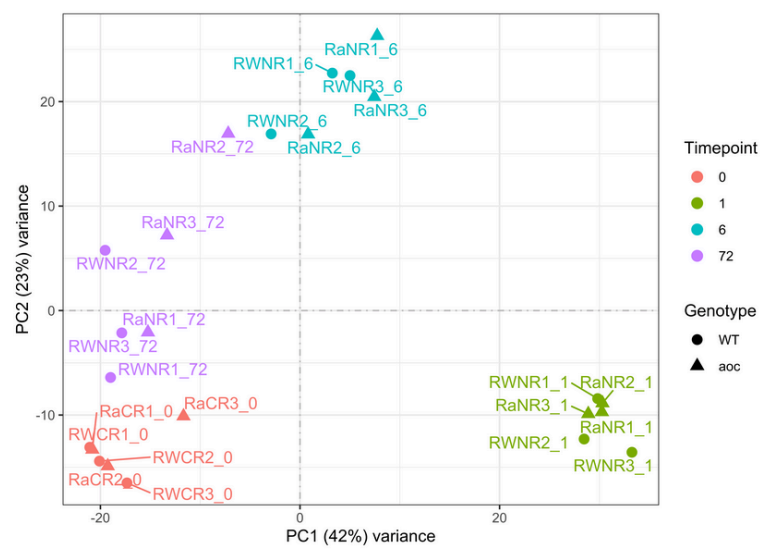


FIGURE S1. Developmental phenotypes of rice wild-type (WT) and jasmonate-deficient (*aoc*) seedlings exposed to control or 100 mM NaCl (salt) solutions. Two representative plants from each condition were photographed 5 days after exposure. Arrows on control plants designate second (lower) and third leaves (a). Seminal root length was measured and represented in boxplots with $n = 20$ (except *aoc*-control, $n = 17$) (b). Asterisk * indicates significant difference (ANOVA plus Tukey's HSD tests, $*P < 0.05$).

(a) Global



(b) Roots



(c) 2nd Leaf

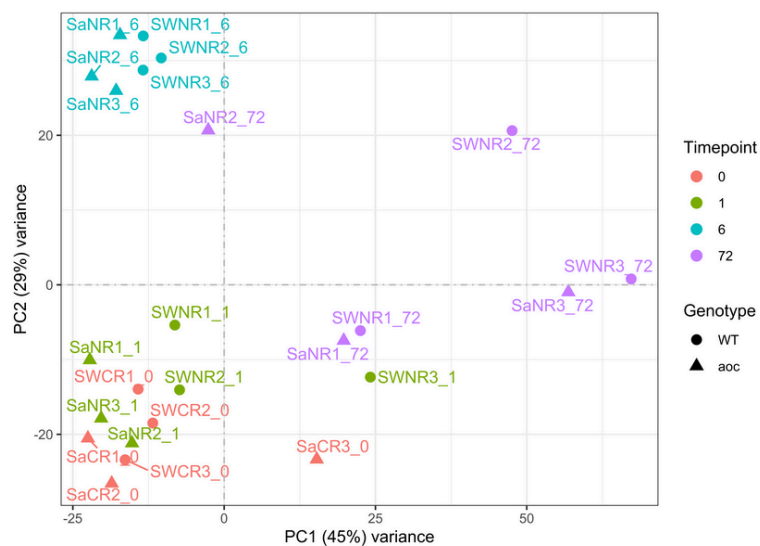
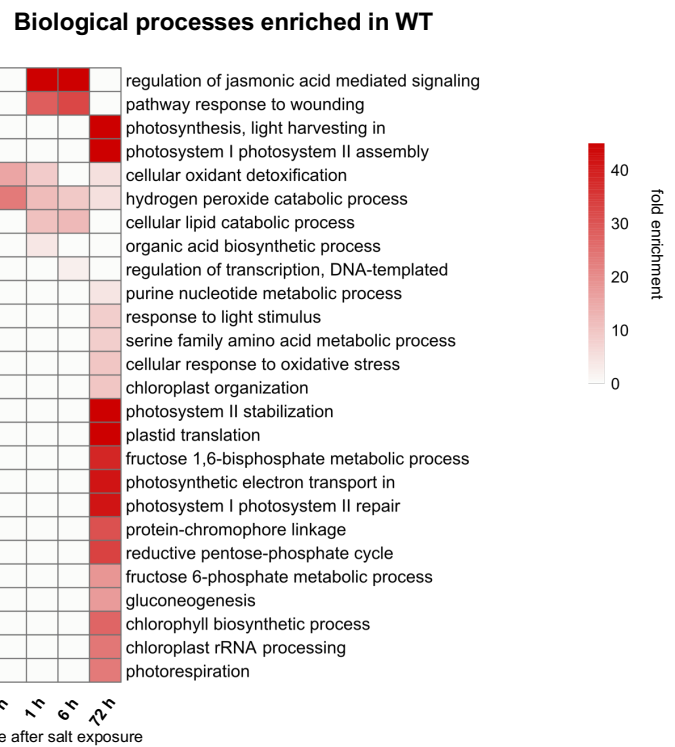
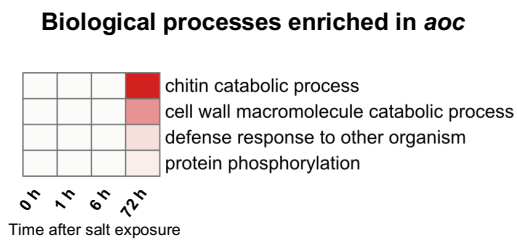


FIGURE S2. Principal component analysis (PCA) of RNAseq data distribution. Global normalization was applied to root and 2nd leaf samples (Total of 48 samples with each biological condition in 3 independent replicates (a). Sample designation: R or S = Root or Shoot; W or a = WT or aoc; Rx = replicate number. Root samples only (24) were normalized and analyzed in (b). 2nd leaf samples only (24) were normalized and analyzed in (c).

(a) **Roots**



(c) **2nd Leaf**

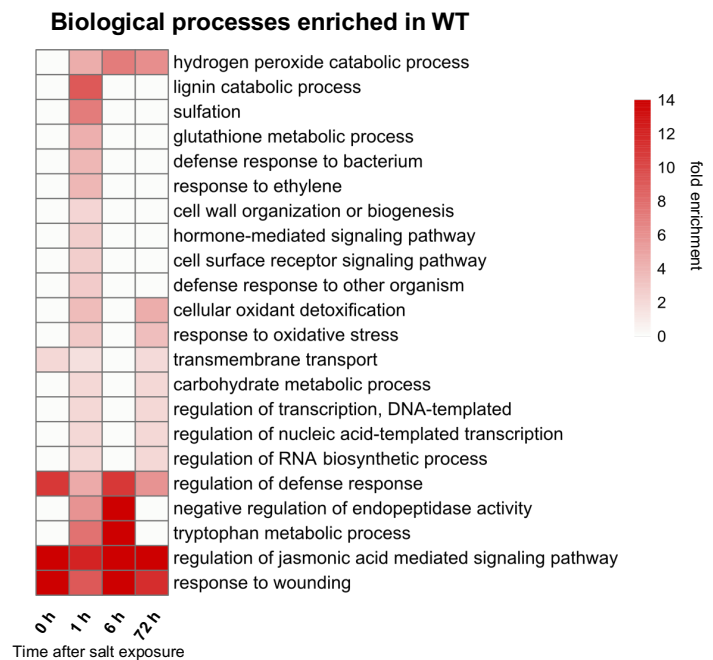
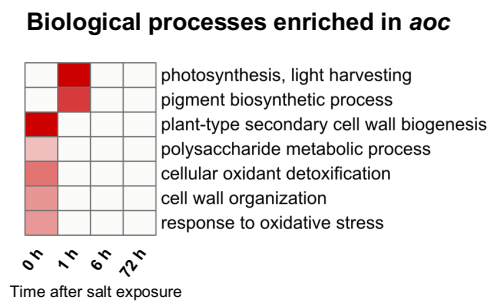


FIGURE S3. Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes (DEGs). DEG lists at each time point relative to 0 h were submitted to GO analysis and enrichment of biological processes (FDR < 0.01) in *aoc* or WT was displayed as heatmaps for roots (a) and 2nd leaf (c). Roots were photographed at 6 days after exposure.

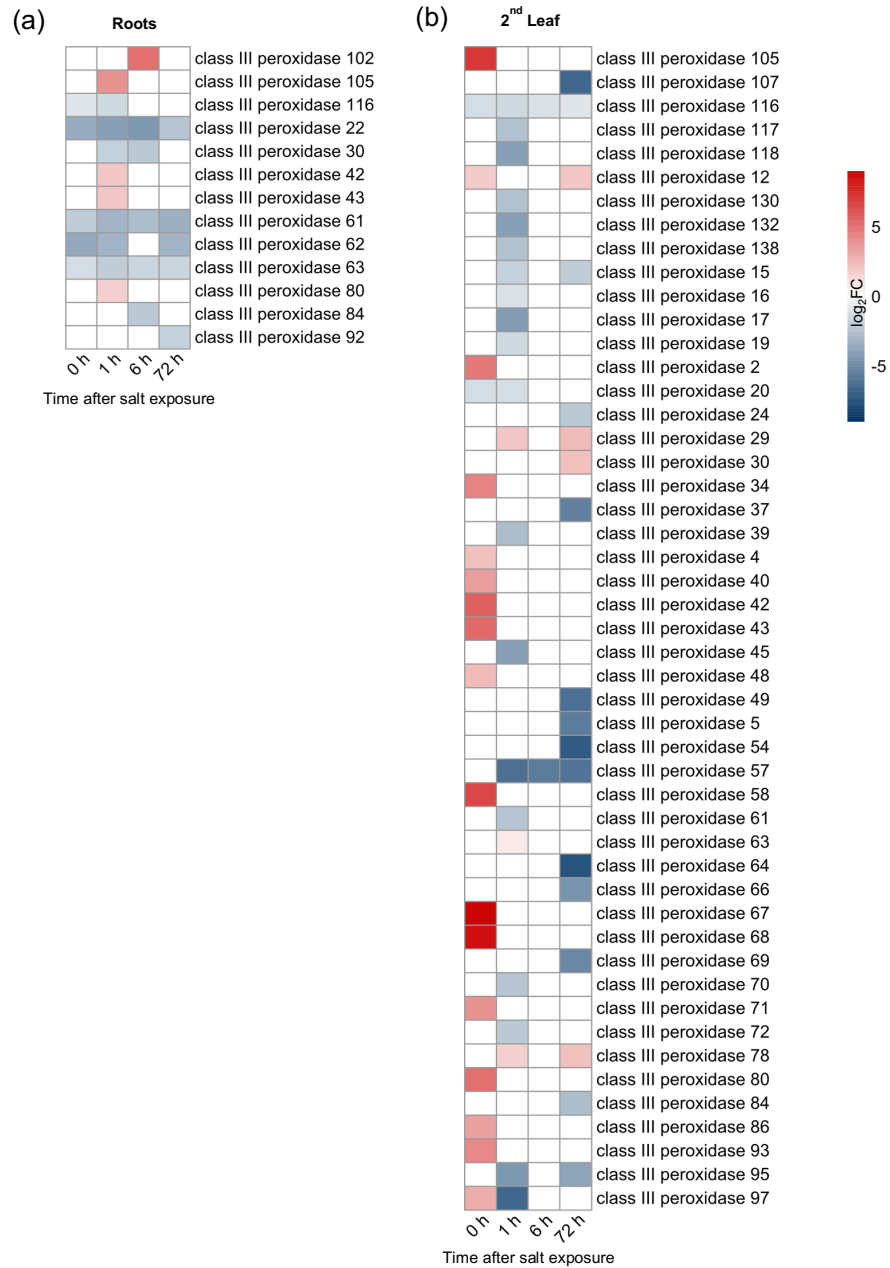


FIGURE S4. Kinetic expression profile of rice class III peroxidase genes displayed as heatmaps in root (a) and 2nd leaf (b).

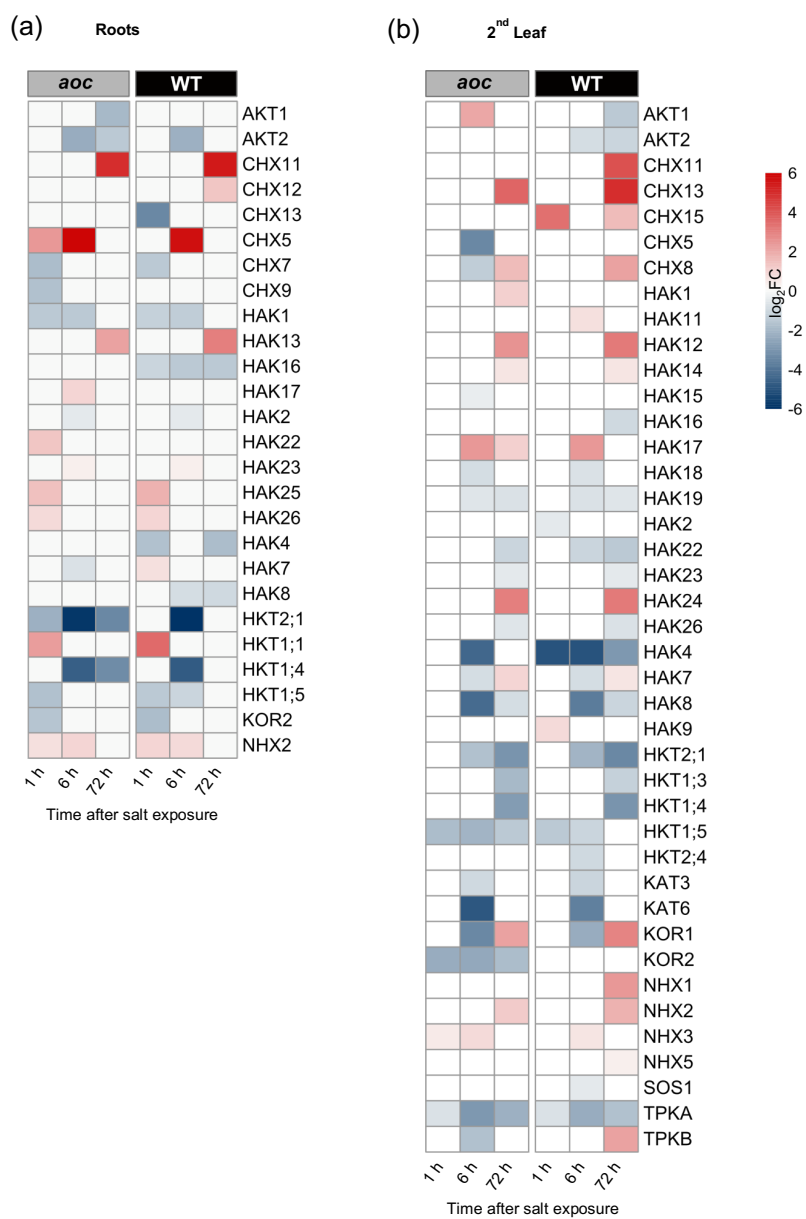
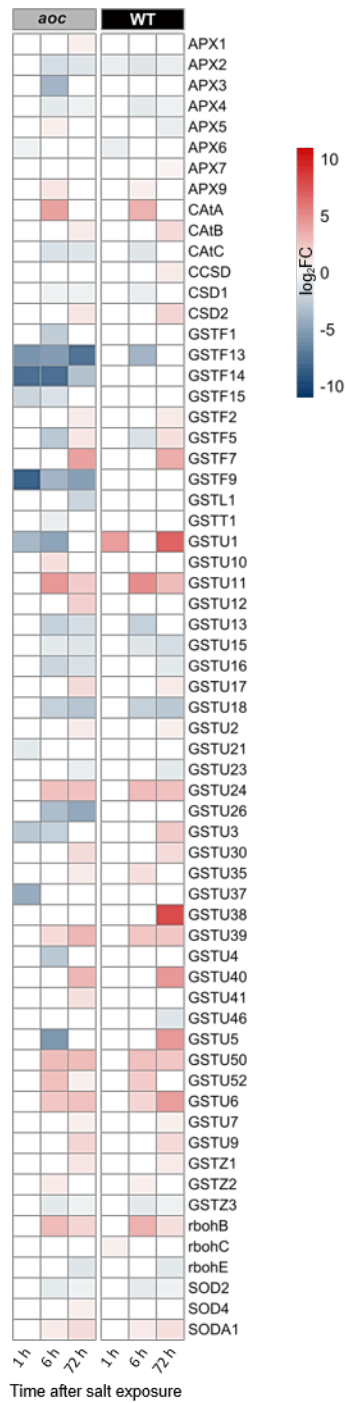


FIGURE S5. Kinetic expression profile of rice ion transporter genes displayed as heatmaps in root (a) and 2nd leaf (b).

(a) ROS detoxification genes



(b) Senescence associated genes (SAG)

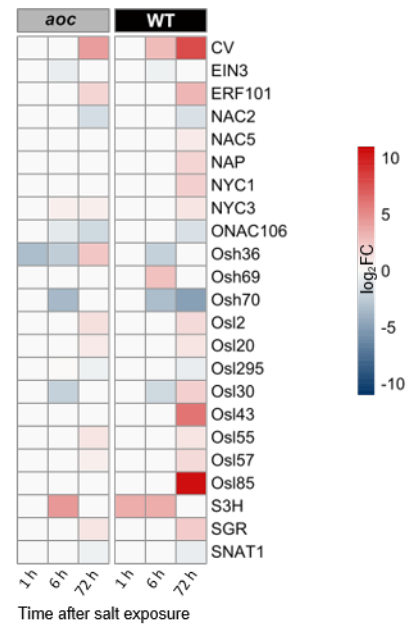
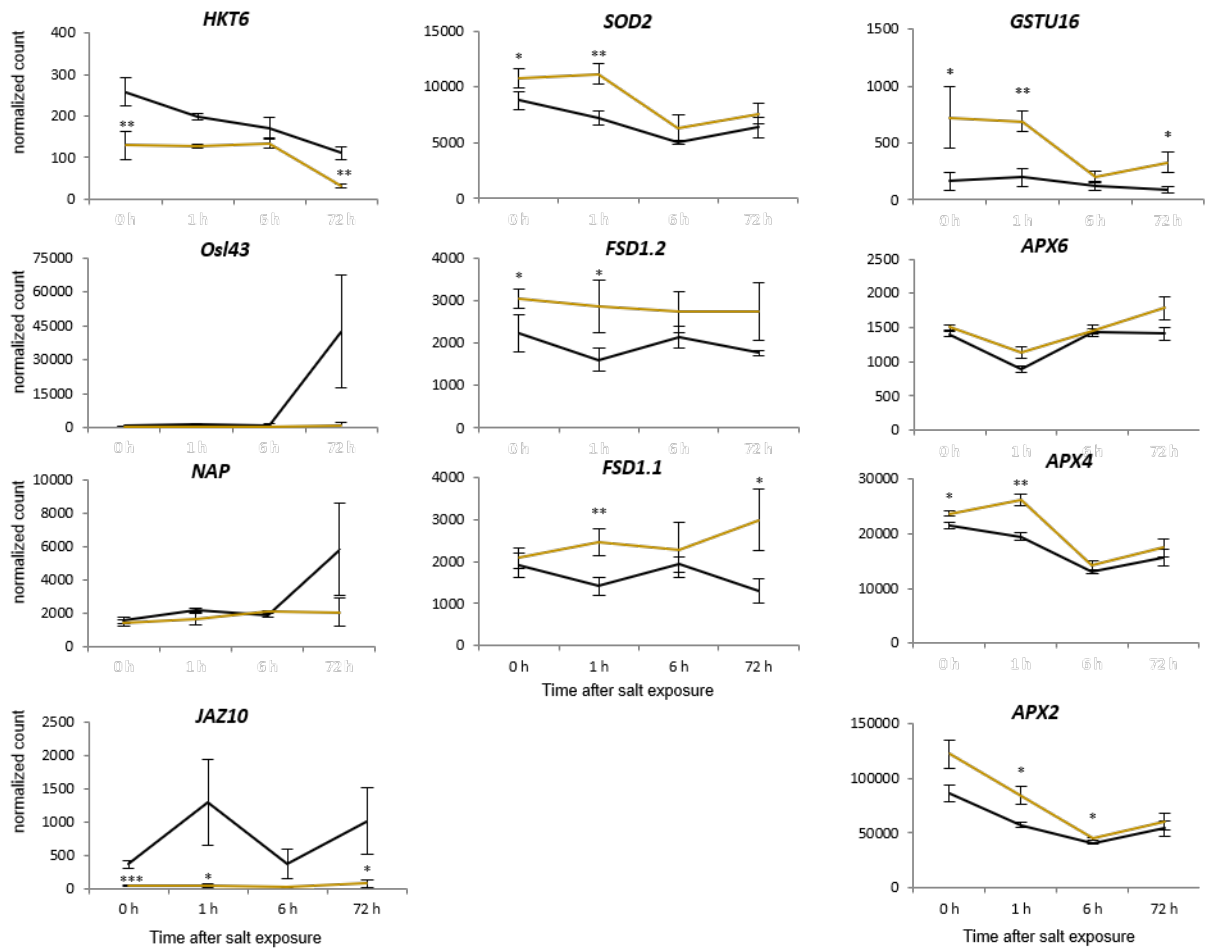


FIGURE S6. Kinetic expression profile of rice genes encoding ROS-scavenging or –consuming activities displayed as heatmaps in root (a) and 2nd leaf (b) of *aoc* and WT plants.

(a) Expression profile of shoot targets in RNAseq data



(b) Expression profile of Roots targets in RNAseq data

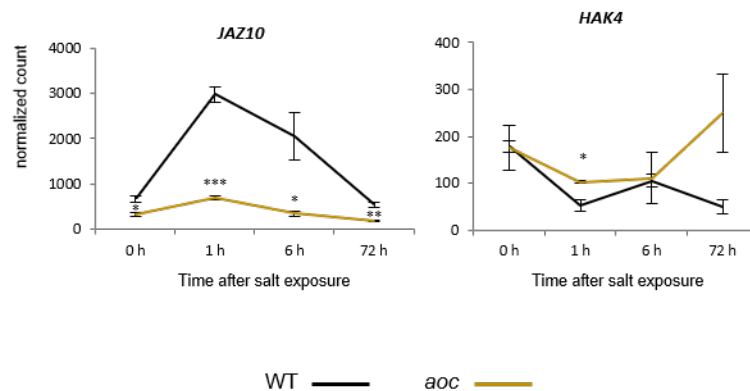


FIGURE S7. Kinetic expression profile of rice genes identified as probable targets of JA signaling upon salt stress. Asterisks indicate a significant difference in means (ANOVA plus Tukey's HSD tests, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 Student's t test ***P < 0.001).

TABLE S 1. Lists of selected pathway genes that were screened for salt- and JA-regulated expression. (excel file)

TABLE S 2. Matrix of differential expression for genes encoding rice transcription factors (TFs) taking in account organ, salt impact (down or up), genotype (WT or aoc) and timing. The table can be filtered for specific expression profiles to retrieve TFs acting in peculiar conditions. (excel file)

TABLE S 4. Global gene expression table in WT and aoc rice seedlings upon salt stress. Time points 0 h, 1 h, 6 h, 72 h post-salt application are shown. Different sheets display salt vs control or mutant vs WT changes for root or 2nd leaf expression. (excel file)

Target	Gene ID	Forward primer	Reverse primer
UBQ5	Os01g0328400	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
UBQ10	Os02g0161900	GAGCCTCTGTTCTGCAAGTA	ACTCGATGGTCCATTAAACC
FSD1.1	Os06g0115400	TCACGTGTACTCCAGTGTGC	GCATCGGAAGCGGTTTCATC
FSD1.2	Os06g0143000	ACAACGGCAACCCATTACCA	TGGCTGCATTGATTCCCAGA
NAP	Os03g0327800	AGTTCCGCAACACCTCCA	CTGCTCGTGGTCCGGAGAG
Osl43	Os01g0348900	AGGCGTGACAATCTACAG	GGTCCAGAAATCTCCTTGA

TABLE S 3. Primers used

REFERENCES

- Abouelsaad, I. & Renault, S.** (2018) Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant def-1 exposed to NaCl stress. *J Plant Physiol*, **226**, 136-144.
- Ahmad, R.M., Cheng, C., Sheng, J., Wang, W., Ren, H., Aslam, M. & Yan, Y.** (2019) Interruption of Jasmonic Acid Biosynthesis Causes Differential Responses in the Roots and Shoots of Maize Seedlings against Salt Stress. *Int J Mol Sci*, **20**, E6202.
- Ambastha, V., Sopory, S.K., Tiwari, B.S. & Tripathy, B.C.** (2017) Photo-modulation of programmed cell death in rice leaves triggered by salinity. *Apoptosis*, **22**, 41-56.
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A. & Hayat, S.** (2020) Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol Biochem*, **156**, 64-77.
- Barrs, H.D. & Weatherley, P.E.** (1962) A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Austral J Biol Sci*, **15**, 413-428.
- Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T. & Shen, W.H.** (2010) Arabidopsis histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol*, **154**, 1403-1414.
- Cassan, O., Lèbre, S. & Martin, A.** (2021) Inferring and analyzing gene regulatory networks from multi-factorial expression data: a complete and interactive suite. *BMC Genomics*, **22**, 387.
- Chen, Y., Wang, Y., Huang, J., Zheng, C., Cai, C., Wang, Q. & Wu, C.A.** (2017) Salt and methyl jasmonate aggravate growth inhibition and senescence in Arabidopsis seedlings via the JA signaling pathway. *Plant Sci*, **261**, 1-9.
- Choudhary, P., Pramitha, L., Rana, S., Verma, S., Aggarwal, P.R. & Muthamilarasan, M.** (2021) Hormonal crosstalk in regulating salinity stress tolerance in graminaceous crops. *Physiol Plant*, **173**, 1587-1596.
- Daudi, A. & O'brien, J.A.** (2012) Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. *Bio Protoc*, **2**, e263.
- De Ollas, C. & Dodd, I.C.** (2016) Physiological impacts of ABA-JA interactions under water-limitation. *Plant Mol Biol*, **91**, 641-650.
- Delgado, C., Mora-Poblete, F., Ahmar, S., Chen, J.T. & Figueroa, C.R.** (2021) Jasmonates and Plant Salt Stress: Molecular Players, Physiological Effects, and Improving Tolerance by Using Genome-Associated Tools. *Int J Mol Sci*, **22**, 3082.

- Fang, C., Zhang, H., Wan, J., Wu, Y., Li, K., Jin, C., Chen, W., Wang, S., Wang, W., Zhang, H., Zhang, P., Zhang, F., Qu, L., Liu, X., Zhou, D.X. & Luo, J.** (2016) Control of Leaf Senescence by an MeOH-Jasmonates Cascade that Is Epigenetically Regulated by OsSRT1 in Rice. *Mol Plant*, **9**, 1366-1378.
- Feng, H., Tang, Q., Cai, J., Xu, B., Xu, G. & Yu, L.** (2019) Rice OsHAK16 functions in potassium uptake and translocation in shoot, maintaining potassium homeostasis and salt tolerance. *Planta*, **250**, 549-561.
- Formentin, E., Sudiro, C., Perin, G., Riccadonna, S., BaRizza, E., Baldoni, E., Lavezzo, E., Stevanato, P., Sacchi, G.A., Fontana, P., Toppo, S., Morosinotto, T., Zottini, M. & Lo Schiavo, F.** (2018) Transcriptome and Cell Physiological Analyses in Different Rice Cultivars Provide New Insights Into Adaptive and Salinity Stress Responses. *Front Plant Sci*, **9**, 204.
- Ganie, S.A., Wani, S.H., Henry, R. & Hensel, G.** (2021) Improving rice salt tolerance by precision breeding in a new era. *Curr Opin Plant Biol*, **60**, 101996.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M.R.H., Masud, A.A.C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., Nahar, K. & Fujita, M.** (2021) Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *Int J Mol Sci*, **22**, 9326.
- Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P. & Riemann, M.** (2015) Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *J Exp Bot*, **66**, 3339-3352.
- Hazman, M., Sühnel, M., Schäfer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., Marquis, V., Herrgott, L., Miesch, L., Riemann, M. & Heitz, T.** (2019) Characterization of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) Hormonal Catabolic Pathways in Rice upon Wounding and Salt Stress. *Rice (N Y)*, **12**, 45.
- Heitz, T.** (2021) Lipids: Jasmonate Metabolism: Shaping Signals for Plant Stress Adaptation and Development. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, Elsevier, pp. 790-803.
- Isayenkov, S.V. & Maathuis, F.J.M.** (2019) Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front Plant Sci*, **10**, 80.
- Ismail, A.M. & Horie, T.** (2017) Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, **68**, 405-434.
- Jadamba, C., Kang, K., Paek, N.C., Lee, S.I. & Yoo, S.C.** (2020) Overexpression of Rice Expansin7 (Osexpa7) Confers Enhanced Tolerance to Salt Stress in Rice. *Int J Mol Sci*, **21**, E454.
- Jia, Q., Li, M.W., Zheng, C., Xu, Y., Sun, S., Li, Z., Wong, F.L., Song, J., Lin, W.W., Li, Q., Zhu, Y., Liang, K., Lin, W. & Lam, H.M.** (2021) The soybean plasma membrane-localized cation/H⁺ exchanger GmCHX20a plays a negative role under salt stress. *Physiol Plant*, **171**, 714-727.

- Julkowska, M.M. & Testerink, C.** (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci*, **20**, 586-594.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. & Bohnert, H.J.** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, **13**, 889-905.
- Kazan, K.** (2015) Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci*, **20**, 219-229.
- Kong, W., Zhong, H., Gong, Z., Fang, X., Sun, T., Deng, X. & Li, Y.** (2019) Meta-Analysis of Salt Stress Transcriptome Responses in Different Rice Genotypes at the Seedling Stage. *Plants (Basel)*, **8**, E64.
- Kurotani, K., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H., Ishimaru, Y., Tashita, R., Suzuki, T., Ueda, M., Hattori, T. & Takeda, S.** (2015a) Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol*, **56**, 779-789.
- Kurotani, K., Yamanaka, K., Toda, Y., Ogawa, D., Tanaka, M., Kozawa, H., Nakamura, H., Hakata, M., Ichikawa, H., Hattori, T. & Takeda, S.** (2015b) Stress Tolerance Profiling of a Collection of Extant Salt-Tolerant Rice Varieties and Transgenic Plants Overexpressing Abiotic Stress Tolerance Genes. *Plant Cell Physiol*, **56**, 1867-1876.
- Lee, S. & Masclaux-Daubresse, C.** (2021) Current Understanding of Leaf Senescence in Rice. *Int J Mol Sci*, **22**, 4515.
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuillemot, R. & Pfister, H.** (2014) UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Trans Vis Comput Graph*, **20**, 1983-1992.
- Li, Q., Ma, C., Tai, H., Qiu, H. & Yang, A.** (2020) Comparative transcriptome analysis of two rice genotypes differing in their tolerance to saline-alkaline stress. *PLoS One*, **15**, e0243112.
- Liang, C., Wang, Y., Zhu, Y., Tang, J., Hu, B., Liu, L., Ou, S., Wu, H., Sun, X., Chu, J. & Chu, C.** (2014) OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 10013-10018.
- Lim, C., Kang, K., Shim, Y., Sakuraba, Y., An, G. & Paek, N.C.** (2020) Rice ETHYLENE RESPONSE FACTOR 101 Promotes Leaf Senescence Through Jasmonic Acid-Mediated Regulation of OsNAP and OsMYC2. *Front Plant Sci*, **11**, 1096.
- Liu, J., Zhang, W., Long, S. & Zhao, C.** (2021) Maintenance of Cell Wall Integrity under High Salinity. *Int J Mol Sci*, **22**, 3260.
- Liu, M., Yu, H., Ouyang, B., Shi, C., Demidchik, V., Hao, Z., Yu, M. & Shabala, S.** (2020) NADPH oxidases and the evolution of plant salinity tolerance. *Plant Cell Environ*, **43**, 2957-2968.

- Marquis, V., Smirnova, E., Graindorge, S., Delcros, P., Villette, C., Zumsteg, J., Heintz, D. & Heitz, T. (2022)** Broad-spectrum stress tolerance conferred by suppressing jasmonate signaling attenuation in Arabidopsis JASMONIC ACID OXIDASE mutants. *Plant J*, **109**, 856-872.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. & Thomas, P.D. (2019)** PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **47**, D419-D426.
- Mirdar Mansuri, R., Shobbar, Z.S., Babaeian Jelodar, N., Ghaffari, M.R., Nematzadeh, G.A. & Asari, S. (2019)** Dissecting molecular mechanisms underlying salt tolerance in rice: a comparative transcriptional profiling of the contrasting genotypes. *Rice (N Y)*, **12**, 13.
- Muñoz, P. & Munné-Bosch, S. (2019)** Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function. *Trends Plant Sci*, **24**, 1040-1051.
- Nguyen, T.H., Mai, H.T.T., Moukouanga, D., Lebrun, M., Bellafiore, S. & Champion, A. (2020)** CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing of the Jasmonate Biosynthesis OsAOC Gene in Rice. *Methods Mol Biol*, **2085**, 199-209.
- Ponce, K.S., Meng, L., Guo, L., Leng, Y. & Ye, G. (2021)** Advances in Sensing, Response and Regulation Mechanism of Salt Tolerance in Rice. *Int J Mol Sci*, **22**, 2254.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedemann, P.E. (1989)** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **975**, 384-394.
- Qiu, Z., Guo, J., Zhu, A., Zhang, L. & Zhang, M. (2014)** Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, **104**, 202-208.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. & Grill, E. (2010)** ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci*, **15**, 395-401.
- Razzaque, S., Haque, T., Elias, S.M., Rahman, M.S., Biswas, S., Schwartz, S., Ismail, A.M., Walia, H., Juenger, T.E. & Seraj, Z.I. (2017)** Reproductive stage physiological and transcriptional responses to salinity stress in reciprocal populations derived from tolerant (Horkuch) and susceptible (IR29) rice. *Sci Rep*, **7**, 46138.
- Riemann, M. (2020)** Phenotyping of Light Response on JA-Defective Mutant in Rice. *Methods Mol Biol*, **2085**, 23-28.
- Riemann, M., Dhakarey, R., Hazman, M., Miro, B., Kohli, A. & Nick, P. (2015)** Exploring Jasmonates in the Hormonal Network of Drought and Salinity Responses. *Front Plant Sci*, **6**, 1077.

- Saddhe, A.A., Mishra, A.K. & Kumar, K.** (2021) Molecular insights into the role of plant transporters in salt stress response. *Physiol Plant*,
- Sade, N., Umnajkitikorn, K., Rubio Wilhelmi, M.D.M., Wright, M., Wang, S. & Blumwald, E.** (2018) Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *J Exp Bot*, **69**, 867-878.
- Sah, S.K., Reddy, K.R. & Li, J.** (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Plant Sci*, **7**, 571.
- Tang, G., Ma, J., Hause, B., Nick, P. & Riemann, M.** (2020) Jasmonate is required for the response to osmotic stress in rice. *Environmental and Experimental Botany*, **175**, 104047.
- Thalmann, M. & Santelia, D.** (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol*, **214**, 943-951.
- Toda, Y., Tanaka, M., Ogawa, D., Kurata, K., Kurotani, K., Habu, Y., Ando, T., Sugimoto, K., Mitsuda, N., Katoh, E., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hattori, T. & Takeda, S.** (2013) RICE SALT SENSITIVE3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors and regulates jasmonate-induced gene expression and root cell elongation. *Plant Cell*, **25**, 1709-1725.
- Valenzuela, C.E., Acevedo-Acevedo, O., Miranda, G.S., Vergara-Barros, P., Holuigue, L., Figueroa, C.R. & Figueroa, P.M.** (2016) Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in Arabidopsis primary root. *J Exp Bot*, **67**, 4209-4220.
- Van Zelm, E., Zhang, Y. & Testerink, C.** (2020) Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annu Rev Plant Biol*, **71**, 403-433.
- Véry, A.A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C. & Sentenac, H.** (2014) Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: what do we learn from comparison between plant species. *J Plant Physiol*, **171**, 748-769.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M. & Sharma, S.** (2017) Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front Plant Sci*, **8**, 161.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A.M. & Close, T.J.** (2007) Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant Cell Environ*, **30**, 410-421.
- Wojciechowska, N., Sobieszczuk-Nowicka, E. & Bagniewska-Zadworna, A.** (2018) Plant organ senescence - regulation by manifold pathways. *Plant Biol (Stuttg)*, **20**, 167-181.

- Wu, H., Ye, H., Yao, R., Zhang, T. & Xiong, L.** (2015) OsJAZ9 acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice. *Plant Sci*, **232**, 1-12.
- Yang, C., Ma, B., He, S.J., Xiong, Q., Duan, K.X., Yin, C.C., Chen, H., Lu, X., Chen, S.Y. & Zhang, J.S.** (2015) MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 Regulate Ethylene Response of Roots and Coleoptiles and Negatively Affect Salt Tolerance in Rice. *Plant Physiol*, **169**, 148-165.
- Yang, Y. & Guo, Y.** (2018) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytol*, **217**, 523-539.
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z. & Xia, G.** (2020) How Plant Hormones Mediate Salt Stress Responses. *Trends Plant Sci*, **25**, 1117-1130.
- Zhai, Y., Wen, Z., Fang, W., Wang, Y., Xi, C., Liu, J., Zhao, H., Wang, Y. & Han, S.** (2021) Functional analysis of rice OSCA genes overexpressed in the arabidopsis *osca1* mutant due to drought and salt stresses. *Transgenic Res*, **30**, 811-820.
- Zhang, H., Liu, Y., Wen, F., Yao, D., Wang, L., Guo, J., Ni, L., Zhang, A., Tan, M. & Jiang, M.** (2014) A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *J Exp Bot*, **65**, 5795-5809.
- Zhang, J., Xu, T., Liu, Y., Chen, T., Zhang, Q., Li, W., Zhou, H., Zhang, Y. & Zhang, Z.** (2022) Molecular Insights into Salinity Responsiveness in Contrasting Genotypes of Rice at the Seedling Stage. *Int J Mol Sci*, **23**, 1624.
- Zhang, M., Liang, X., Wang, L., Cao, Y., Song, W., Shi, J., Lai, J. & Jiang, C.** (2019) A HAK family Na⁺ transporter confers natural variation of salt tolerance in maize. *Nat Plants*, **5**, 1297-1308.
- Zhao, W., Wang, K., Chang, Y., Zhang, B., Li, F., Meng, Y., Li, M., Zhao, Q. & An, S.** (2022) OsHyPRP06/R3L1 regulates root system development and salt tolerance via apoplastic ROS homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ*, **45**, 900-914.
- Zou, X., Liu, L., Hu, Z., Wang, X., Zhu, Y., Zhang, J., Li, X., Kang, Z., Lin, Y. & Yin, C.** (2021) Salt-induced inhibition of rice seminal root growth is mediated by ethylene-jasmonate interaction. *J Exp Bot*, **72**, 5656-5672.

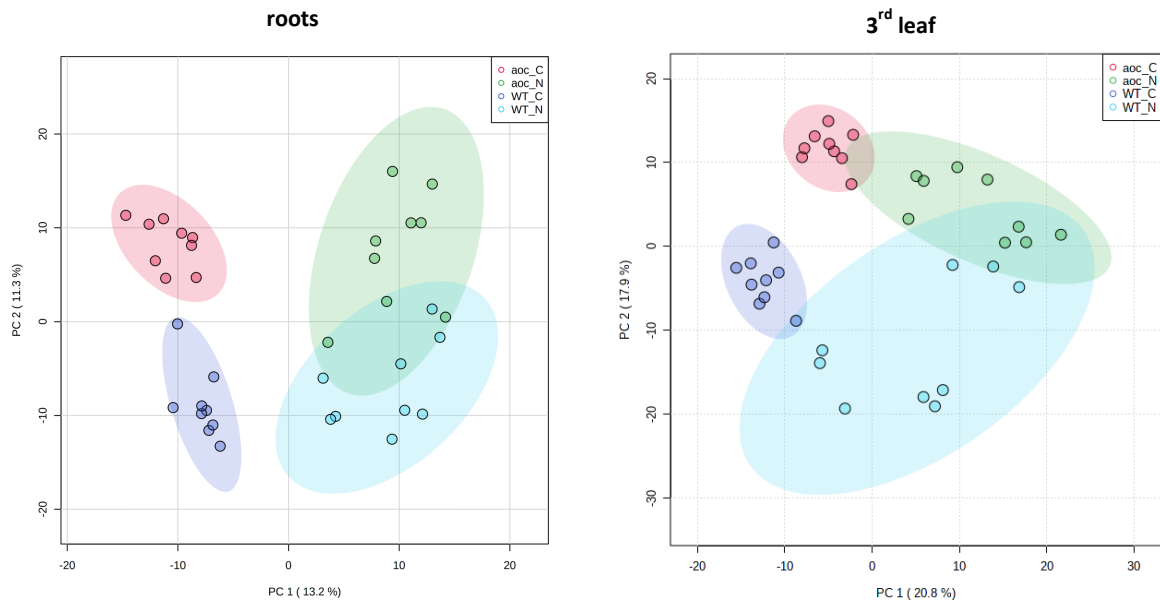


Figure III.9 : Analyse en composantes principales (ACP) de la distribution du métabolome des feuilles et racines des plantes WT et *aoc* exposées ou pas au stress salin.

Chaque génotype est représenté par 9 réplicas biologiques. Chaque réplicat est composé d'un pool de matériel prélevé sur 5 plantes. Les extraits ont été soumis à une analyse métabolique non-ciblée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). WT_C : plantes WT control ; WT_N : plantes WT exposées au sel ; aoc_C : plantes *aoc* control ; aoc_N : plantes *aoc* exposées au sel.

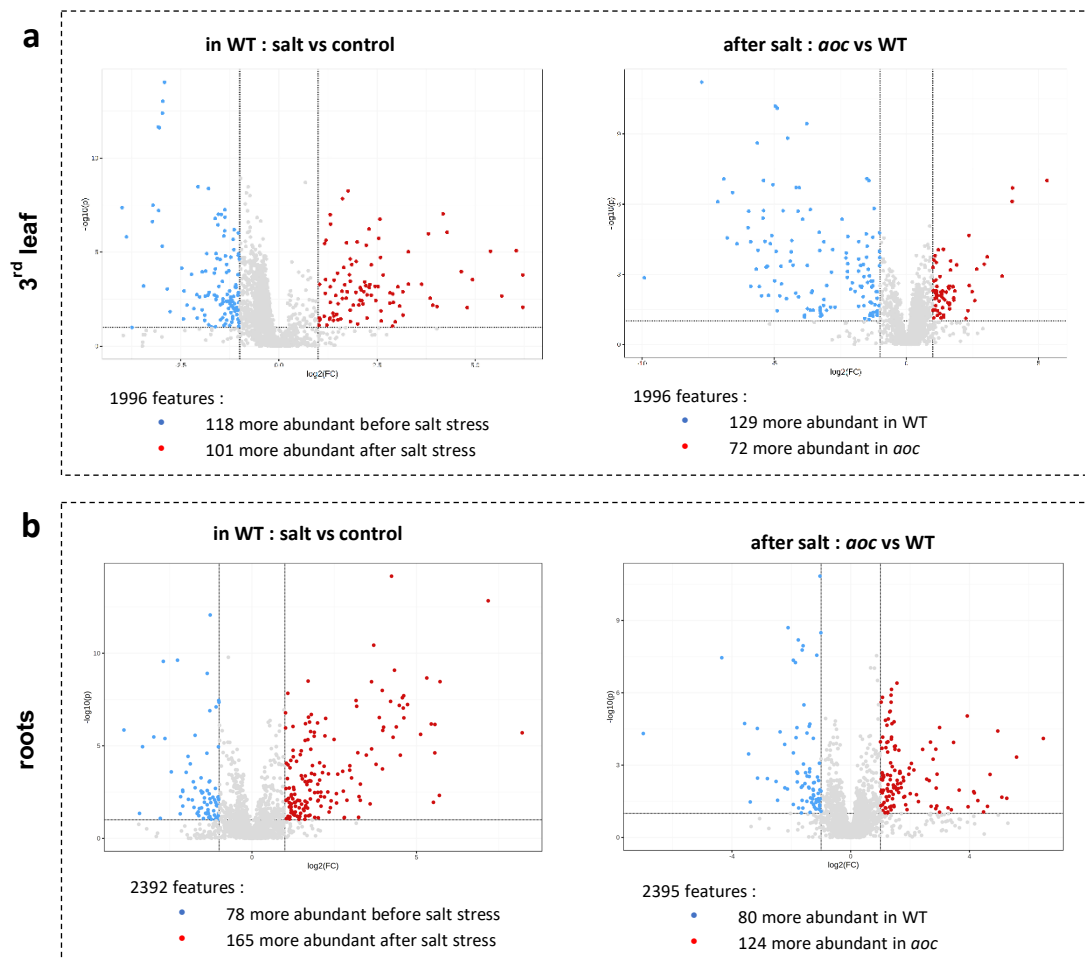


Figure III.8 : Volcano plots illustrant l'abondance différentielle des composés identifiés par LC-HRMS dans les feuilles et racines du WT avant et après stress salin et entre le mutant *aoc* et le WT après stress salin. L'analyse a été réalisée à l'aide de la plateforme Metaboanalyst. ($-1 < \log_2 FC > 1$; $p\text{-value} < 0.1$).

3. Analyse comparative du métabolome des plantes WT et *aoc* après stress salin

Pour obtenir un aperçu complémentaire des changements physiologiques pouvant résulter de la déficience en JA et/ou de l'exposition au sel, nous avons ensuite réalisé, avec l'aide de Claire Villette (plateforme PIMS, IBMP), une étude métabolomique non ciblée dans les tissus des racines et les jeunes feuilles avant et 4 jours après l'exposition au sel. Outre les racines, les 3^{èmes} feuilles qui ne présentent pas de symptômes dans nos conditions ont été choisies pour éviter les changements métaboliques indirects qui peuvent survenir dans la 2^{ème} feuille en voie de sénescence chez le WT. Les composés « médio-polaires » extraits avec du méthanol ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). Dans les deux organes, l'Analyse en Composante Principale (ACP) a montré que les deux génotypes étaient mieux séparés dans des conditions non stressées qu'après un stress salin (Figure III.8). Les données ont été exploitées pour les changements d'abondance de composés déclenchés par le sel d'une part et pour les différences d'accumulation des composés entre génotypes sous stress d'autre part ($1 < \log_2 FC < -1$, $pval < 0,1$). Dans les extraits de racines WT, 78 composés sont plus abondants dans le contrôle et 165 après le stress (Figure III.9.b). Parmi les composés annotés et régulés à la baisse par le sel chez WT, on trouve les acides aminés Ala, Arg, Lys, Pro, dont 3 restent plus abondants dans les racines *aoc* (Figure III.9b). Les phénolamides, une classe de composés défensifs régulés par les JAs (Dong et al., 2015), sont curieusement réprimés par le sel chez WT (Figure III.10b). Les composés suraccumulés en présence de sel comprennent les momilactones diterpéniques et certains dérivés du tryptophane et de l'indole, notamment le 5-hydroxy-Trp, la sérotonine (5-hydroxyl-tyramine) et la féruloyl-sérotonine qui sont d'ailleurs plus abondants chez le mutant *aoc* (Figure III.10b). Ces derniers sont des intermédiaires dans la synthèse de la mélatonine, qui est connue pour retarder de manière endogène ou exogène la sénescence et améliorer la tolérance au stress salin chez le Riz (Liang et al., 2015; Yu et al., 2018; Wang et al., 2018; Hong et al., 2018). Il convient aussi de noter que l'acide citrique et l'acide salicylique, deux acides organiques qui confèrent également une protection contre les dommages causés par le stress abiotique (Tahjib-UI-Arif et al., 2021; Nadarajah et al., 2021) sont nettement plus abondants dans les racines des mutants *aoc*.

Dans l'analyse de la 3^{ème} feuille, 219 et 245 composés ont été détectés comme différentiels en réponse au sel chez WT et *aoc* respectivement (Figure III.9.a). Parmi les composés qui ont pu être annotés, de nombreux acides organiques, par exemple les intermédiaires du cycle de Krebs ou de la glycolyse, ont été régulés à la baisse par le sel chez WT, ainsi que certains dérivés phénoliques (Figure III.10a). Comme dans les racines, l'acide citrique est à nouveau moins abondant dans les feuilles WT que celles des mutants, après stress salin. Il semble d'ailleurs réprimé par le sel chez le WT. En revanche, les acides aminés, notamment leucine, phénylalanine, valine, la N-acétyl-lysine et la molécule de défense JA-

ANNOTATED DIFFERENTIAL COMPOUNDS

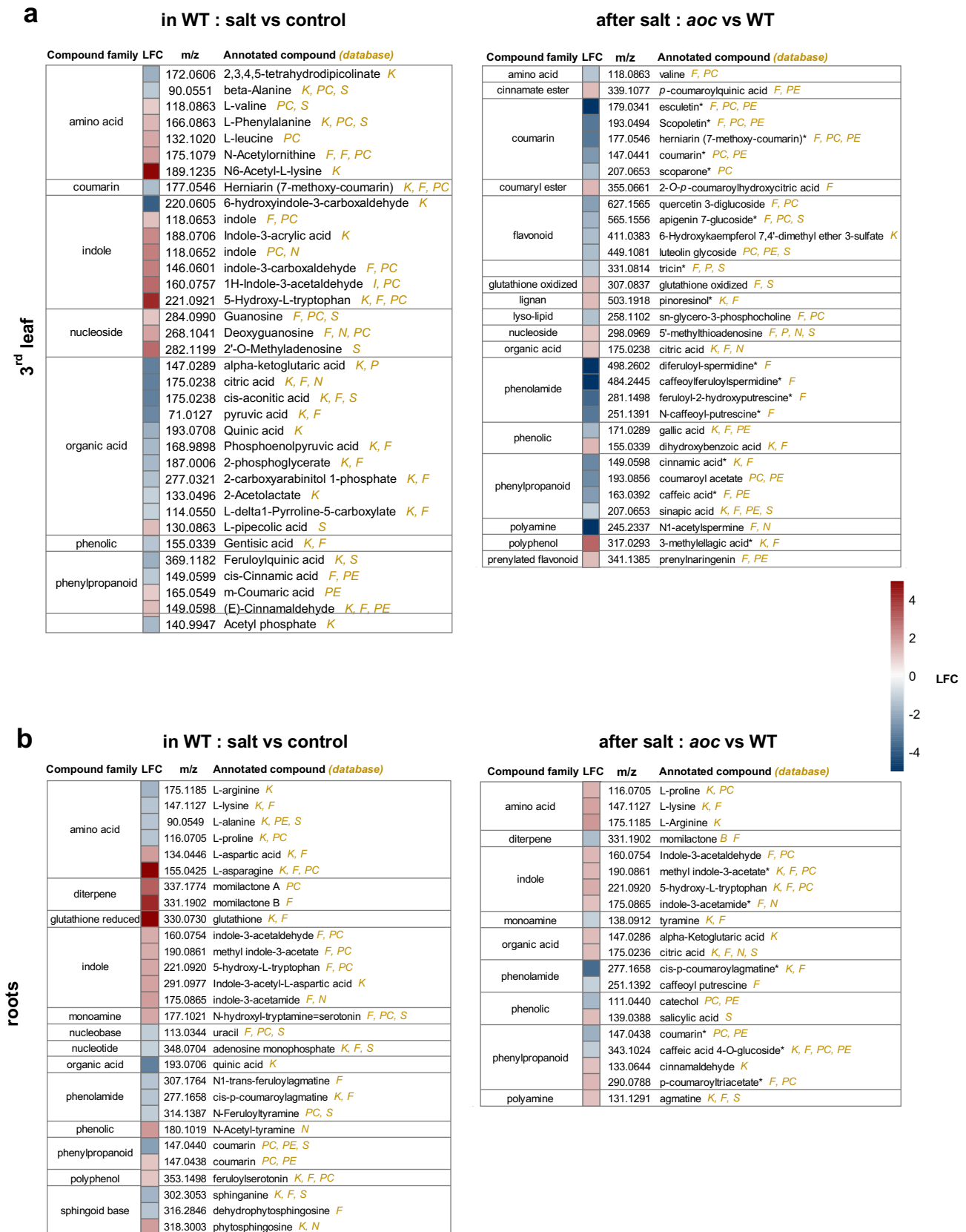


Figure III.10 : Heatmap illustrant l'abondance différentielle des composés annotés parmi ceux identifiés grâce à l'analyse métabolique non-ciblée par LC-HRMS dans les feuilles (a) et racines (b) des plantules WT et aoc après 4 jours de stress salin.

Les composés ont été annotés après interrogation des bases de données interrogées K : KNApSAcK ; F : FoodDB ; PE: PhenolExplorer ; PC : PlantCyc ; N : NPA ; S : Une librairie spectrale interne(PIMS-IBMP). (-1<log₂FC>1 ; p-value < 0.1).

dépendante dérivé de l'arginine, la N-acétyl-ornithine (Adio et al., 2011), sont plus abondants dans les feuilles WT stressées. Comme pour les racines, l'activation du métabolisme du Trp et de l'indole est reflétée par l'accumulation de plusieurs dérivés de l'indole et de 5-OH-Trp. Parallèlement, certains nucléosides modifiés sont augmentés, en particulier la 2'-O-méthyladénosine, un composé dont l'abondance dans l'ARNt a été rapportée en corrélation positive avec la tolérance au sel (Wang et al., 2017). Des tendances similaires sont observées dans les feuilles *aoc* (données non illustrées). Lorsqu'une comparaison directe des génotypes a été réalisée entre les feuilles *aoc* vs WT, des composés différentiels supplémentaires sont révélés : les phénolamides, ici des esters d'acides hydroxycinnamiques et les polyamines spermidine ou putrescine sont largement supprimés par la mutation *aoc* dans la feuille avant et après le stress salin. Plus spécifiquement, un certain nombre de composés phénoliques, y compris les phénylpropanoïdes, les coumarines et les flavonoïdes sont moins abondants chez *aoc* par rapport au WT en condition de stress, reflétant une dépendance partielle du métabolisme des phénylpropanoïdes de la signalisation JA. Enfin, quelques métabolites ont montré une plus grande abondance chez *aoc*, et certains d'entre eux pourraient agir comme marqueurs de tolérance, principalement en raison de leurs propriétés antioxydantes : il s'agit du pinorésinol, une lignane qui pourrait être un sous-produit d'un métabolisme phénylpropanoïde altéré, ainsi que du tannin hydrolysable l'acide 3-méthyl-ellagique, et l'isomère de l'acide gentisique, l'acide dihydroxybenzoïque (Gupta and De, 2017). Ces données restent à prendre avec précaution car l'identification formelle des composés nécessiterait une comparaison avec des standards authentiques. Elles fournissent néanmoins des pistes sur les altérations métaboliques sous influence de la signalisation JA.

4. La mutation *jaoQ* accentue les symptômes induits par le sel chez le WT

L'influence de la signalisation JAs sur la tolérance/sensibilité du Riz aux différentes composantes du stress salin ont été étudiées dans cette étude sur le plan phénotypique, transcriptionnel et métabolique à travers l'analyse comparative des mutants déficients en JAs *aoc* et des plantes WT. Cela a permis de révéler certains processus biologiques et des métabolites régulés positivement ou négativement par la signalisation JAs et qui contribueraient à la mise en place des phénotypes contrastés observés entre les plantes WT et *aoc*. Cette influence des JAs sur l'ampleur des symptômes induits par le stress salin a été démontrée chez différentes espèces dans des études utilisant, pour la plupart, un apport externe de JAs sur des plantes sauvages afin de suractiver la signalisation JAs (Qiu et al., 2014; Chen et al., 2017; Farhangi-AbRiz and Ghassemi-Golezani, 2018). Le manque de concordance des conclusions de ces études, sur le réel impact de la signalisation JAs dans la mise en place des réponses au stress salin, a justifié l'utilisation d'une approche génétique dans notre étude plutôt que l'application de JAs dont les effets peuvent être aléatoire selon l'espèce, le mode et la durée d'application. Le mutant *jaoQ* constitue un outil de génétique supplémentaire, qui possède des niveaux de JA-Ile endogène nettement supérieurs au WT (Figure II.18, Chapitre II). Ce surplus de JA-Ile est responsable d'une activation de la signalisation JAs en absence de

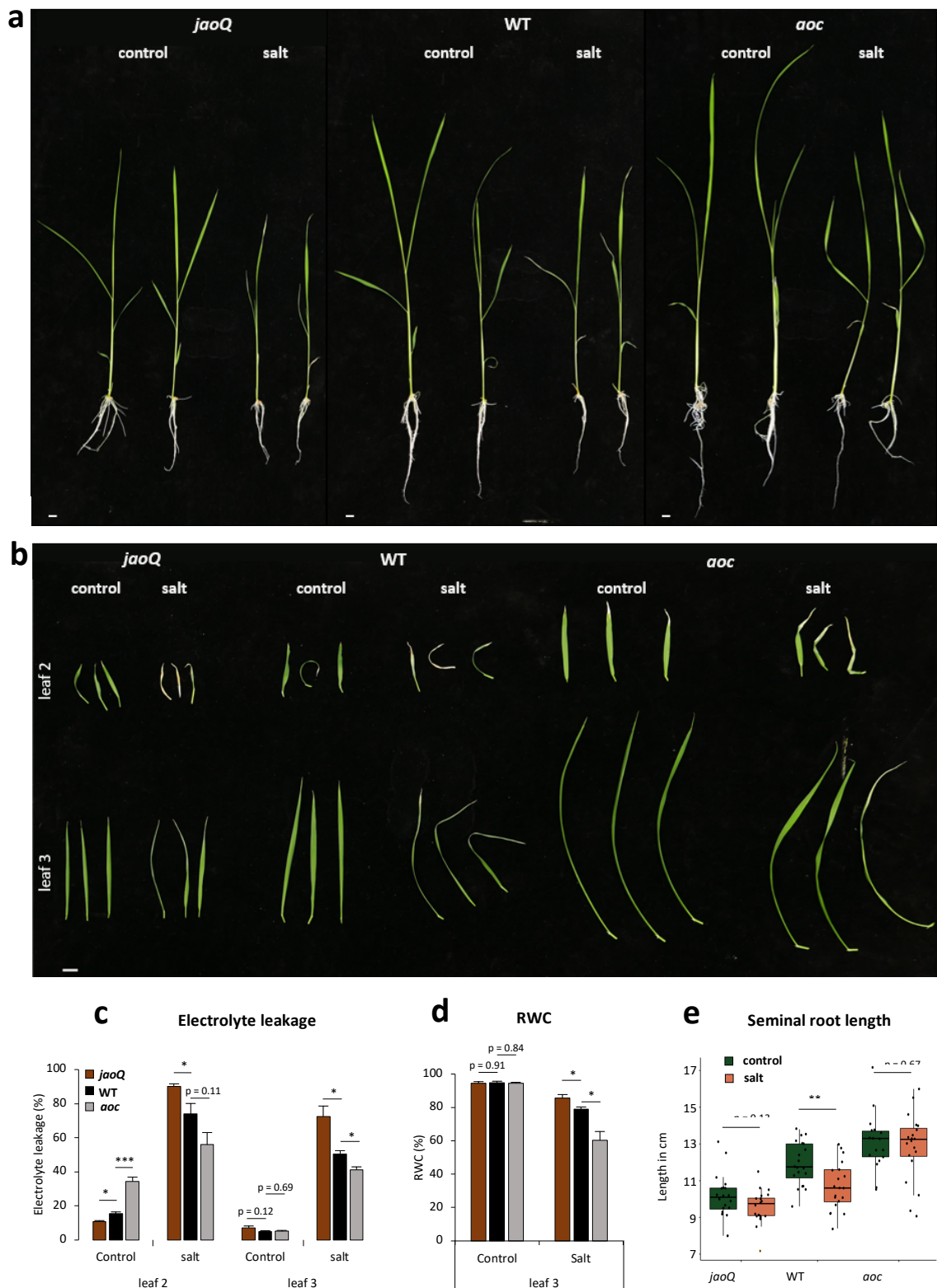


Figure III.11 : **Phénotype de plantules WT, de mutants *aoc* et de mutants *jaoQ* soumis à un stress salin.**

Des plantules WT et *aoc* de 11 jours cultivées en hydroponie ont été soumises à 5 jours de stress salin (100 mM de NaCl) a. Photographie des plantules après les 5 jours de stress salin. b. Photographie des feuilles 2 et 3 détachées des plantules WT, *aoc* et *jaoQ* après les 5 jours de stress salin. Quantification de la fuite d'électrolytes (c) et de la teneur en eau (d) dans les feuilles et mesures de la longueur de la racine séminale (e) des plantules WT, *aoc* et *jaoQ* après les 5 jours de stress salin. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de 4 répétitions biologiques. Les boîtes à moustaches représentent 20 mesures faites dans les deux conditions sur chacun des 3 génotypes. Les astérisque indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues (student t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

tout stimulus *jaoQ* affectant aussi bien la croissance des mutants *jaoQ* que leur réponse au stress hydrique (Figure II.19;23-24, Chapitre II). Nous avons donc décidé de comparer la tolérance au stress salin de ce mutant *jaoQ* avec les plantes WT et *aoc* utilisées jusque-là.

Pour ce faire, les plantes des trois génotypes ont été soumises au stress salin en hydroponie en utilisant les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Après 5 jours d'exposition au sel, on observe que toutes les plantes *aoc*, *jaoQ* et WT présentent une nette réduction de la croissance de leur partie aérienne (Figure III.11.a). Au niveau des racines, le stress salin réduit également la croissance de la racine séminale des plantes WT et bien plus légèrement celle des mutants *jaoQ* (Figure III.11.e). Cependant, la racine séminale des mutants *aoc* exposés au sel est de taille quasi similaire à celle des plantes *aoc* contrôle. Ces observations sont très cohérentes avec celles de Zou et al. (2021) qui démontraient récemment le rôle prépondérant des JAs dans l'inhibition de la croissance racinaire induite par le sel. Au niveau des feuilles, les dommages tissulaires induits par la toxicité du Na⁺, décrits précédemment par Hazman et al. (2015) et confirmés par nos travaux comme étant plus sévères chez le WT que chez les mutants *aoc*, sont plus prononcés chez les mutants *jaoQ* soumis au stress salin et se propagent d'ailleurs jusque sur les feuilles 4 de ces mutants (Figure III.11.b). Cela est manifesté par une fuite d'électrolyte plus importante sur les feuilles 2 et 3 des mutant *jaoQ* que sur celles des plantes WT et *aoc* (Figure III.11.c). A l'opposé, les mutants *jaoQ* retiennent plus d'eau sur leurs feuilles 3 que les plantes WT et *aoc* après stress salin (Figure III.11.d). De ce fait, le mutant *jaoQ* apparaît donc plus sensible au stress ionique mais moins sensible à la déprivation d'eau induits par le stress salin que les plantes sauvages et les mutants *aoc* utilisés jusqu'ici.

5. En terre comme en hydroponie, le WT plus sensible à la toxicité du Na⁺ que les *aoc*

Pour finir, nous nous sommes également intéressés à la reproductibilité des phénotypes différentiels observés entre les mutants déficients en JAs *aoc* et les plantes WT après stress salin sur un système de culture en terre, préférentiellement utilisé pour la production de Riz. Sur cette expérience le stress salin est soumis aux plantes de façon graduelle après 13 jours de croissance. Les pots de culture des plantes sont d'abord placées pendant 5 jours sur une solution saline à 100 mM de NaCl puis transférées pour 20 jours supplémentaires sur une solution à 150 mM NaCl. A l'image des phénotypes obtenues sur le système hydroponique, l'exposition au sel en terre induit une forte inhibition de la croissance de la partie aérienne des plantes WT et *aoc* qui résulte sur une biomasse considérablement réduite des plantes soumises au stress salin (Figure III.12.a). Cela est illustré par un poids frais et un poids sec nettement plus bas des plantes exposées au sel, notamment chez le mutant *aoc* qui présente une biomasse déjà plus importante que le WT en absence de sel (Figures III.12.c-d). Cependant, les dommages tissulaires causés par le sel apparaissent nettement plus prononcés sur les plantes sauvages sur lesquelles les symptômes nécrotiques sont présentés sur quasiment toutes les feuilles des plantes alors que ceux-ci sont exclus des jeunes feuilles des mutants *aoc* (Figures III.12.b). La sensibilité plus forte des plantes sauvages par rapport aux

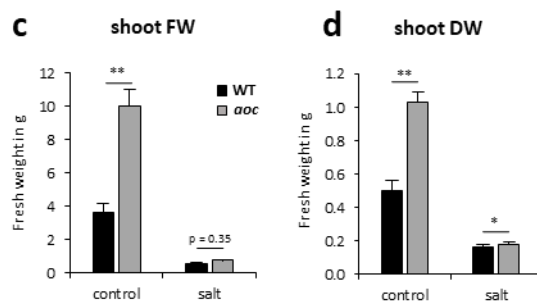
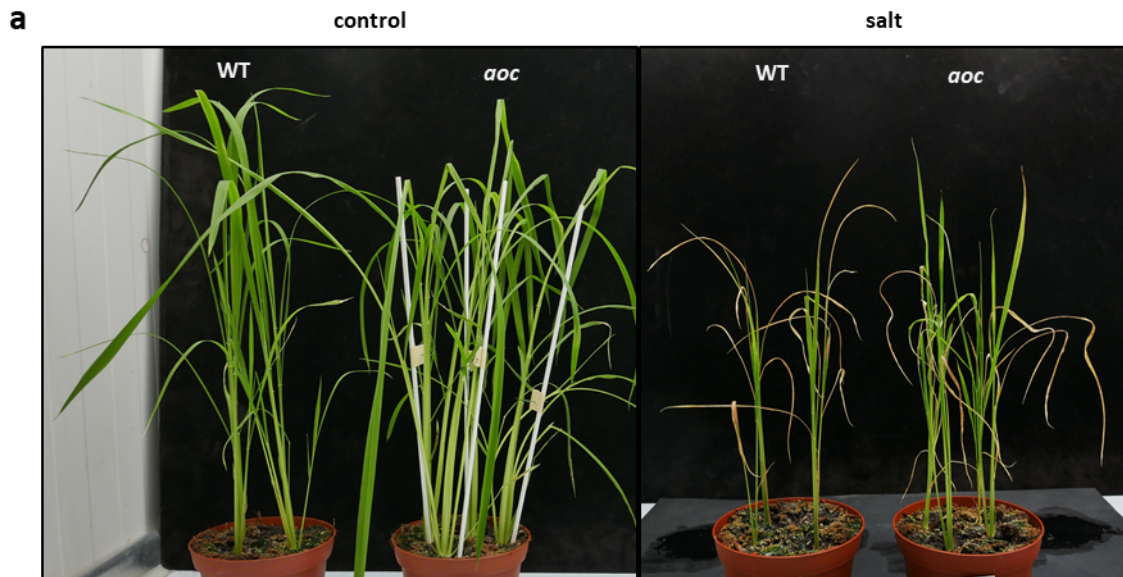


Figure III.12 : **Phénotype de plantes WT et de mutants *aoc* cultivés puis soumis à un stress salin en terre.**

Les plantes ont été cultivées pendant 13 jours puis leur pot de culture placé, pendant 5 jours, sur solution saline à 100 mM de NaCl puis, pendant 20 jours, sur une solution saline à 150 mM de NaCl a. Phénotype de plantes control (31 jours) et de plantes (38 jours) soumises à 25 jours de stress salin (à droite) . b. Comparaison de l'évolution de la nécrose sur la partie aérienne de plantules WT et *aoc* soumises à 25 jours de stress salin, après détachement des feuilles 2 à 4 fortement nécrotiques. Représentation du poids frais (FW) (c) et du poids sec (DW) (d) de la partie aérienne de plantules WT, *aoc* et *jaoQ* soumises à 25 jours de stress salin. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de 3 répétitions biologiques. Les astérisque indiquent une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues (student t-test, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). La longueur de la barre d'échelle correspond à 1 cm de mesure réelle.

mutants *aoc* à la toxicité du Na^+ est de ce fait reproductible même lorsque le stress salin est appliqué en terre et par conséquent indépendant du système de culture. Une exposition plus longue des plantes au sel aurait probablement permis d'évaluer le taux de survie des plantes de chaque génotype et de l'utiliser comme un indicateur supplémentaire de leur tolérance ou sensibilité au sel. Malheureusement, la place limitée dans les armoires de cultures dans laquelle l'expérience a été réalisée ne permettait pas une culture plus longue des plantes contrôles, justifiant l'arrêt de l'expérience et le phénotypage des plantes.

C. Discussion

Ce projet est né des observations antérieures, au KIT, que la déficience génétique de JA pouvait, de manière surprenante, atténuer les symptômes de stress salin (Hazman et al., 2015). Cette étude avait fourni les premiers indices physiologiques et biochimiques soutenant ces phénotypes différentiels. Il a semblé à mes encadrants qu'une étude transcriptionnelle globale permettrait d'aller plus loin pour comprendre ces réponses. Lors du choix d'utiliser le nouveau mutant *aoc*, obtenu par CRISPR (Nguyen et al., 2019a), dans cette nouvelle étude, nous pensions que la réplication du phénotype dans la variété Kitaake serait une simple formalité. La longue optimisation qui a suivi a été fastidieuse mais payante, car elle a permis, en testant plusieurs concentrations salines et temps d'exposition, de prendre conscience de l'impact de ces paramètres sur la cinétique de mise en place des composantes osmotiques et ioniques du stress salin. L'expérience que nous avons acquise avec le système suggère que des conditions d'application différentes du sel produisent des réponses moléculaires différentes à un temps donné, et contribuent sûrement aux phénotypes disparates décrits dans la littérature.

1. Dynamiques d'activation différentes de la synthèse des JAs dans les racines et les feuilles

L'exploration des réponses JAs dépendantes sous-jacentes aux symptômes observés chez les plantes de Riz sauvages exposées au sel nécessitait, au préalable, de situer plus précisément la dynamique d'activation de la signalisation JAs par le sel, dans nos conditions expérimentales. Des études antérieures avaient réussi à montrer que la biosynthèse et la signalisation des JAs, dans les feuilles de Riz, sont induites quelques minutes à quelques heures après exposition au sel bien que les dommages tissulaires n'apparaissent que des jours plus tard (Hazman et al., 2015; Chen et al., 2016; Kurotani et al., 2015b). Sur la base de ces observations, on pouvait donc anticiper que les JAs, précocement induits par le sel, activent une séquence temporelle d'événements moléculaires dont l'impact n'est visible que plus tard dans la réponse. Dans le cadre d'une étude du transcriptome, une possibilité était que le temps précoce de la réponse soit enrichi en gènes régulateurs (TFs, kinases, etc..) alors que les temps plus tardifs contiendraient plus de fonctions liées à l'"exécution" de la tolérance/sensibilité. Dans nos conditions expérimentales, les profils de JAs établis confirment en effet l'induction très précoce de la synthèse de JAs dans les feuilles et les racines des plantes WT. Celle-ci s'estompe néanmoins très rapidement dans

les feuilles, et laisse place à une seconde phase d'induction des JAs, tardive mais plus proche de l'apparition des symptômes. Ces observations révèlent par conséquent l'existence, non pas d'un, mais de deux événements indépendants d'activation de la signalisation JAs dans les feuilles des plantes soumises au stress salin, structurés probablement par les composantes osmotiques (rapide) et ionique (plus lent) qui se mettent en place avec des dynamiques différentes. L'analyse transcriptomique cinétique entreprise visait donc à déterminer les réponses régulées par ces vagues de JAs induits aux temps précoces et tardifs et d'évaluer leur impact sur la tolérance au sel. Néanmoins, les patterns identifiés n'ont pas confirmé clairement une séparation temporelle de fonctions régulatrices précoces et de fonctions cibles tardives.

2. l'analyse transcriptomique révèle la complexité de la composante JA-dépendante de la réponse au sel

La complexité du design expérimental (2 organes, 2 géotypes, 4 temps, 3 répétitions biologiques, soit 48 bibliothèques) a généré un jeu de données massif, dont l'exploitation a constitué un défi méthodologique, et dont la résolution n'était pas routinière dans l'équipe. Plusieurs outils et approches bioinformatiques ont été testés, mais certains (Clustering – Cassan et al., 2021) reposaient sur un choix à priori de comportements transcriptionnels, ou alors (Diagrammes de Venn) ne prenaient pas en compte la dynamique cinétique, qui est pourtant un atout de l'étude. Finalement, l'extraction des processus biologiques par analyse des « GO terms » et leur représentation sous forme de « heatmap » temporel (manuscrit Ndecky et al.) a été choisie pour l'information synthétique qu'elle produit. Cette analyse transcriptomique a surtout mis en évidence l'influence relativement forte de la signalisation JAs sur la mise en place des réponses au sel dans les feuilles de Riz. De grandes fonctions ciblées par le stress salin ont ainsi été révélées, avec un impact négatif des JAs, comme la photosynthèse, ou un impact positif, comme la modification de la paroi cellulaire, la senescence, la synthèse de tréhalose, la détoxification des ROS et la signalisation ABA.

Dans les feuilles du mutant *aoc*, l'induction après stress de l'expression de gènes de biosynthèse et de réponse de l'ABA, et l'accumulation d'ABA sont fortement réduits comparé au WT, un ensemble de données cohérent expliquant la conductance stomatale augmentée et les pertes d'eau plus importantes observées chez *aoc*. Ces résultats démontrent la nécessité des JAs pour la pleine induction de l'ABA et, en conséquence, l'activation efficace de mécanismes de réponse à la déprivation d'eau causée par l'exposition au sel chez les feuilles de Riz. L'impact positif des JAs sur la tolérance à la déprivation d'eau chez le Riz avait d'ailleurs récemment été rapporté par Tang et al. (2020), dans un contexte de stress osmotique appliqué avec du PEG. Il n'est cependant pas exclu que les JAs régulent également la tolérance à la déprivation d'eau de manière ABA-indépendante. Par exemple, deux facteurs de transcription, C3H10 (zinc finger CCCH domain-containing protein 10) et ZFP182 (zinc finger protein 182), dont l'expression

ectopique chez le Riz améliore considérablement la tolérance des plantes au stress hydrique (Huang et al., 2012; Seong et al., 2020) corégulent de façon très nette avec les gènes de réponse aux JAs.

Par ailleurs, le comportement des familles de gènes codant des fonctions biologiques liées à la tolérance saline ont également été directement examinées dans le transcriptome pour pallier les limites de l'approche non ciblée qui explore les « GO terms » enrichis dans le transcriptome. Cette approche alternative révèle d'autres cibles transcriptionnelles des JAs dont l'expression altérée par les JAs après stress salin pourrait contribuer à l'accentuation des dommages tissulaires causés par le sel chez le WT. Par exemple, la répression par les JAs dans les racines du transporteur ionique HAK4, impliqué dans l'exclusion de l'excédent de Na⁺ du xylème racinaire (Zhang et al., 2019), pourrait expliquer les taux de sodium plus élevés dans la feuille 2 des plantes WT après stress salin. En outre, plusieurs gènes codant des enzymes de détoxification des ROS spécifiques de certaines familles telles que les Peroxydases de classe III et les superoxydes dismutases (SOD) sont régulés par les JAs avant et après stress salin mais, pour la plupart, la signification biologique reste encore incomprise, dans la mesure où le degré de redondance dans ces familles est souvent méconnu. De façon plus distincte, on observe une répression spécifique par les JAs de l'expression des superoxydes dismutases chloroplastiques FSD1.1 et FSD1.2 dans les feuilles. Leur dérégulation chez *aoc* pourrait améliorer la capacité de détoxification des ROS dans ce compartiment, favorisant la gestion du stress oxydatif pour limiter les dommages, par exemple à l'appareil photosynthétique. Enfin, l'expression de certains gènes activateurs de la sénescence (SAG) tels que *OsNAP* et *OsI43* est également positivement régulée par les JAs, contribuant très probablement à l'accentuation de la nécrose sur les feuilles des plantes sauvages.

Globalement, l'analyse transcriptomique a permis d'éclaircir la dualité de l'action des JAs sur la composante osmotique et ionique. En réponse au stress salin, la signalisation JAs est bénéfique pour réduire avec l'ABA les pertes d'eau et prévenir le flétrissement des feuilles alors qu'elle contribue, à long terme, à l'accentuation des dommages tissulaires induite par la toxicité du sodium. Certains processus biologiques énoncés plus haut ont certes été décrits par des études antérieures comme étant régulés par les JAs à savoir la réponse au stress hydrique (Mohamed and Latif, 2017; Tang et al., 2020a), l'induction de la sénescence (Uji et al., 2017; Zhou et al., 2013) et l'homéostasie des ions (Wu et al., 2015) mais, dans la présente étude, leur exploration simultanée a permis de mieux comprendre la dynamique de l'impact des JAs sur la mise en place des réponses au stress salin. La controverse existante quant au rôle négatif ou positif des JAs sur la tolérance au stress salin chez les plantes pourrait être expliquée par l'observation unilatérale des symptômes induits par la composante osmotique ou par la composante ionique dont les ampleurs dépendent fortement de la concentration en sel utilisée.

3. D'autres marqueurs moléculaires JAs-dépendants de la tolérance au sel révélés par l'analyse métabolique non-ciblée

L'analyse du transcriptome a l'avantage d'être exhaustive, mais est assez loin parfois du phénotype. Il est bien connu que toutes les régulations physiologiques n'ont pas lieu au niveau transcriptionnel, mais dépendent de facteurs complexes comme l'activité et les interactions des protéines, ou le flux dans les voies métaboliques. L'analyse du métabolome, même si elle ne donne qu'un accès très partiel aux métabolites, peut donner une indication plus réaliste et complémentaire des bases phénotypiques. Relativement, peu d'analyses métabolomiques ont été réalisées chez le Riz en réponse au sel (Chang et al., 2019; Wang et al., 2021b) et aucune en recherchant l'impact du JA. On sait pourtant que la signalisation JAs exerce une influence très importante sur le métabolisme des plantes, bien mieux démontrée dans les réponses aux stress biotiques où elle permet la synthèse de molécules de défense tels que des phéromones (Yuan et al., 2008) ou la phytoalexine sakuranétine chez le Riz (Riemann et al., 2013; Shimizu et al., 2012) pour la défense contre les agresseurs. Nous avons exploré l'impact des JAs sur les profils métaboliques de la feuille 3 un jour avant l'apparition macroscopique des symptômes induits par le stress salin (4 jours de stress). La méthode d'extraction biphasique utilisée pour les feuilles était motivée par notre volonté d'analyser les sucres par GC-MS après dérivatisation de la phase polaire. Par manque de temps, cela n'a pu être réalisé et notre analyse s'est focalisée au final que sur les composés « médio-polaires » présents dans les extraits méthanoliques.

La forte influence des JAs sur le métabolisme est particulièrement reflétée sur les métabolomes des plantes sauvages et des mutants déficients en JAs *aoc*. Dans les racines comme dans les feuilles 3, on note une divergence très nette des métabolomes des deux génotypes en absence de tout stimulus (Figure III.8). Ces divergences sont ensuite moins marquées lorsque les plantes sont soumises au stress salin (Figure III.8), suggérant que les deux génotypes opèrent des changements métaboliques assez similaires lorsqu'elles sont soumises au stress salin. Nous avons répertorié près de 200 composés à abondance différentielle entre les deux génotypes dans les racines ainsi que dans les feuilles (Figure III.9). Dans les racines, on note après stress salin une nette réduction des teneurs en proline chez le WT dont les niveaux restent plus élevés chez le mutant *aoc*. La proline est connue comme un osmoprotectant dont l'accumulation en réponse aux stress abiotiques favorise la tolérance au stress des plantes (Figure III.10.b). Malheureusement, le phénotypage très superficiel des racines réalisé dans nos expériences ne permet pas de déterminer l'importance physiologique de cette accumulation différentielle de proline dans les racines des deux génotypes. Cette observation reste néanmoins cohérente avec celles de Verma et al. (2019) qui ont démontré chez *Arabidopsis* que la régulation négative de la synthèse de proline par MYC2 contribuerait à la sensibilité plus forte des plantes sauvages Col0 au sel comparé aux mutants *atmyc2*. Dans les feuilles, on note après stress salin chez le WT la réduction de l'accumulation de l'acide gentisique (acide dihydroxybenzoïque) et de l'acide citrique, deux composés associés à la tolérance au sel dont les niveaux restent également plus

élevés chez le mutant *aoc* que chez le WT (Figure III.10.a) (Gupta and De, 2017; Tahjib-Ul-Arif et al., 2021). La synthèse de l'acide gentisique et de l'acide citrique semblerait donc négativement régulée par la signalisation JAs activée en réponse au sel chez le WT, à l'instar de la proline. Cela réduirait alors la capacité de tolérance au sel des plantes WT contribuant à l'accentuation des phénotypes contrastés observés entre les plantes sauvages et le mutant après stress salin. La validation de cette hypothèse nécessiterait tout d'abord de confirmer l'identité de ces composés par une analyse plus ciblée. Il deviendra ensuite pertinent de déterminer, par une approche transcriptionnelle, de quelle manière les JAs contrôlent la biosynthèse de ces trois marqueurs de tolérance au stress salin.

4. La dualité de l'action des JAs sur la tolérance au sel confirmée en terre et chez le mutant *jaoQ*

Grace aux analyses globales, métabolomiques et transcriptomiques non ciblées, couplées à des validations physiologiques, on connaît maintenant de grandes fonctions biologiques et quelques gènes et métabolites individuels régulés par la signalisation hormonale des JAs et déterminants dans la tolérance au sel. Ces résultats permettent d'expliquer comment les JAs contribuent d'une part à l'aggravation des dommages tissulaires du stress salin décrits précédemment (Kurotani et al., 2015b; Hazman et al., 2015) et observées dans nos propres expériences réalisées en hydroponie (Figure III.11 & Figure 1-MS salt) et sur terreau (Figure III.12) et d'autre part à la tolérance à la déprivation d'eau induite par le stress salin (Figure III.11 & Figure 6-MS salt), ou encore par un stress osmotique réalisé avec du PEG 6000 (Tang et al., 2020a). Par conséquent, la signalisation JAs activée en réponse au stress salin chez le Riz est multiple et ne peut être associée exclusivement à la sensibilité ou la tolérance au sel puisqu'elle influence de manière très opposée la réponse aux composantes ionique et osmotique du stress salin. Forts de cette découverte, nous avons finalement utilisé la lignée *jaoQ* développée dans le projet OsJAO et décrite dans le chapitre précédent. Cette lignée présentant des signes manifestes d'activation constitutive de la voie JA, au moins dans les parties aériennes, la relation entre cette signalisation et la tolérance au sel pouvait être testée sous un angle opposé à la lignée *aoc*. Cette hypothèse a bien été confirmée par l'observation de la meilleure rétention d'eau et la nécrose plus marquées chez le mutant *jaoQ*. Il est néanmoins difficile de distinguer à ce stade si chez *jaoQ* l'ampleur des réponses au sel est dû à la signalisation forte avant même l'exposition au sel ou à l'incapacité du mutant à réduire le flux de JAs induits par le sel et, en conséquence, d'atténuer la signalisation JAs induites. Cela reste une question ouverte pour laquelle on devra définir les approches pour y répondre convenablement. En attendant, l'observation de phénotypes opposés chez ces 2 outils génétiques distincts renforce donc nos conclusions quant au rôle des JAs dans la réponse au stress salin.

Chapitre IV:

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, j'ai utilisé un certain nombre de concepts développés soit dans mon laboratoire d'accueil à l'IBMP pour le métabolisme des JAs, soit au KIT pour la physiologie du stress salin. Le travail sur le modèle Riz, peu introduit à l'IBMP, a nécessité l'interaction étroite avec nos deux partenaires, enrichissant tout en compliquant le travail. Bien que présentés successivement dans ce mémoire, les projets JAO et JA-sel ont été menés simultanément, et ont généré à l'issue une convergence d'outils génétiques pour l'étude de nouvelles fonctions des JAs.

La voie JAO chez le Riz, régulatrice de la signalisation JAs et de réponses JAs-dépendantes

➤ **Quatre « JA Oxidases » codées par le génome du Riz**

La recherche d'orthologues de la protéine AtJAO2 d'Arabidopsis a révélé l'existence de 4 gènes de Riz codant pour des JAO, nommées *OsJAO1*, *OsJAO2*, *OsJAO3* et *OsJAO4* sur la base de la similarité de leur séquence protéique avec celle de AtJAO2. On retrouve d'ailleurs, sur ces séquences protéiques, l'ensemble des résidus essentiels pour la liaison du substrat JA, du cosubstrat 2-OG et du cofacteur Fe²⁺ à l'exception de OsJAO4 qui présente une Thréonine (RXT) à la place de la Sérine (RXS) qui médie en partie la liaison du 2-OG par les 2-ODDs. Cette variation d'acide aminé ne suffit toutefois pas pour supprimer sa fonction Oxidase puisque l'activité « JA Oxidases » de chacune de ces OsJAO a pu être validée à travers des tests *in vitro* et/ou *in vivo*. Cependant, la position exacte du groupement hydroxyle sur le produit des JAO reste non résolue. L'absence quasi-totale de OH-JA chez le quadruple mutant *jaoQ* de Riz malgré la présence de 12OH-JA-Ile suggère que le produit enzymatique de l'Amido hydrolase AH8 (12OH-JA) (Hazman et al., 2019) est différent du produit naturel des OsJAO (potentiellement du 11OH-JA). Cela reste une bonne piste qui enrichira davantage les investigations déjà initiées dans mon laboratoire d'accueil. Actuellement, une approche génétique couplée à des analyses métaboliques (RMN et LC-MS/MS) sont mises au point pour réussir à distinguer, de manière plus précise, le produit enzymatique des JAOs de celui des Amido Hydrolases.

➤ **La fonction régulatrice de la signalisation JAs par la voie JAO confirmée chez le Riz**

L'altération du profil des JAs dans les feuilles non stimulées suite à l'inactivation des OsJAOs révèle le rôle capital de l'activité des JAOs dans le contrôle du flux de JA et la répression de la synthèse systématique de l'hormone active JA-Ile. Cette suraccumulation de JA-Ile génère des perturbations transcriptionnelles et métaboliques qui témoignent d'une suractivation de la signalisation JAs dans les feuilles des mutants *jao*. Ce résultat montre à nouveau l'importance de la gestion métabolique des niveaux de base de JA, souvent négligée par rapport à l'induction de son accumulation post-stress. Contrairement à Arabidopsis où l'essentiel de la fonction JAO est portée par AtJAO2, chez le Riz, les perturbations majeures ne sont visibles que lorsque qu'au moins OsJAO1 et OsJAO2 sont simultanément inactivées.

Une meilleure connaissance des sites d'expression des JAO individuelles serait nécessaire pour appréhender leurs fonctions spécifiques ou redondantes. Il n'a pas été possible de lancer en amont du projet des lignées rapportrices pJAO-GUS, la priorité ayant été donnée à l'IRD aux transformations pour l'obtention des lignées mutées CRISPR.

➤ **La voie JAO, un levier de régulation de la croissance et des réponses JAs dépendantes**

La réduction de croissance des mutants *jao* est une autre conséquence de la suractivation de la signalisation JAs. Par rapport à *Arabidopsis*, l'impact négatif de l'inactivation de la voie JAO sur la croissance semble plus important chez le Riz, alors que le gain défensif reste encore à déterminer. On sait néanmoins que d'autres réponses JAs-dépendantes telles que la photomorphogénèse, la tolérance au stress hydrique et au stress salin sont également altérées chez les mutants *jao*. Dans un futur proche, il sera intéressant de connaître la cause précise de la réduction de croissance et son impact sur la performance reproductive. De même, il sera important de savoir si ces perturbations sont suffisantes pour apporter un gain de résistance à des agressions biotiques. La sensibilité relative des mutants *jao* au champignon *M. oryzae* par rapport aux plantes sauvages et mutants *aoc* (très sensible) est en cours d'évaluation. L'ensemble de ces résultats permettra de déterminer le potentiel d'une modulation générale ou organe-spécifique de la voie JAO pour améliorer des caractéristiques agronomiques chez le Riz cultivé. Il n'est pas encore connu si, dans l'immense variabilité génétique du genre *Oryza*, l'expression des gènes ou l'activité JAO est sujette à un degré de polymorphisme qui influencerait sur les niveaux de signalisation JAs basale et pourrait être reliée à des niveaux de tolérance à divers stress. De telles variations pourraient permettre de définir des marqueurs de sélection potentiellement utiles. Une telle situation est reportée pour HAN1 qui code une JA-Ile oxydase, et dont les niveaux d'expression ont accompagné la domestication de variétés tempérées de Riz (Mao et al., 2019).

➤ **L'activité JAO a-t-elle évolué à partir des ANS ?**

Ces travaux illustrent donc clairement la conservation, chez le Riz, de la fonction « JA Oxydase » (JAO), décrite plus tôt chez *Arabidopsis* (Smirnova et al., 2017; Caarls et al., 2017) et le Tabac (Tang et al., 2020b). Au-delà, elle suggère aussi la présence exclusive de cette fonction « JA Oxydase » chez les Angiospermes. La protéine Sm78989, la 2-ODD la plus proche des JAOs chez la Lycophyte *S. moellendorffii*, présente une faible conservation des résidus qui médient la liaison des JAOs avec le substrat. Cela est d'autant plus surprenant que différentes études ont démontré la présence de l'acide jasmonique (JA) chez *S. moellendorffii* (Stumpe et al., 2010; Yamamoto et al., 2015; Pratiwi et al., 2017). L'apparition des processus enzymatiques permettant la synthèse du JA semblerait donc bien antérieure à celle des enzymes de catabolisme du JA, issues probablement de l'évolution des ANS. Ceci signifierait qu'un mécanisme d'atténuation hormonale a dérivé du métabolisme plus général de synthèse de pigments de type anthocyanes. Cette hypothèse est actuellement explorée dans mon laboratoire d'accueil.

Les JAs, à la fois répresseurs et activateurs d'aspects différents de la tolérance au sel

➤ **Séquences d'activation différentes de la signalisation JAs dans les feuilles et les racines**

Les profils des JAs déterminés dans les racines révèlent une activation rapide et brève de la biosynthèse de JAs alors que dans les feuilles, deux phases d'activation sont observées, soutenues par le suivi de catabolites, reflétant l'avènement séquentiel des composantes osmotique et ionique du stress salin. Ces profils de JAs corrèlent d'ailleurs très nettement avec les profils d'expression des gènes de réponses aux JAs permettant ainsi de mieux localiser les perturbations - au moins - transcriptionnelles occasionnées par les JAs dans les tissus des plantes de Riz sauvages après stress salin. Ces résultats ont notamment permis de répertorier quelques facteurs de transcription (TFs) présentant une co-régulation nette avec les gènes de réponses aux JAs et d'autres TFs spécifiquement exprimés chez le WT à au moins un des temps où la signalisation JAs est activée. Ces listes (Table S2, Ndecky et al., 2022) sont interrogeables pour filtrer tout type de comportement transcriptionnel et constituent une ressource majeure pour la caractérisation des fonctions des JAs dans la réponse au stress salin ou pour d'autres questions futures.

➤ **La signalisation JAs favorise la tolérance à la composante osmotique du stress salin**

L'impact des JAs sur les réponses transcriptionnelles induites par le sel est plus marquée dans les feuilles où cette voie hormonale régule positivement la biosynthèse et la signalisation de l'ABA et contribuerait à promouvoir la rétention d'eau dans les feuilles par la réduction de la conductance stomatale. A ce jour, les cibles directes des JAs impliquées dans ce mécanisme ne sont pas encore définies mais on note la co-régulation des facteurs de transcription C3H10, ZFP182, associés à la tolérance au stress hydrique (Huang et al., 2007; Seong et al., 2020), avec les gènes du pathway JA. L'étude des cibles de ces TFs avec des mutants spécifiques contribuerait probablement à définir le circuit de régulation de la tolérance au stress hydrique par les JAs. D'autres processus également associés à la tolérance au stress hydrique et au stress salin tels que la modification de la paroi cellulaire et la synthèse de l'osmoprotectant trehalose semblent également positivement régulés par les JAs. Leur étude nécessitera des approches dédiées puisque les analyses que nous avons effectuées ne fournissent pas assez d'indices permettant d'expliquer comment leur mise en place est influencée par les JAs.

➤ **La signalisation JAs, réprime la tolérance à la composante ionique du stress salin**

Outre l'impact positif des JAs sur la tolérance à la composante osmotique, nos données apportent différents éléments soutenant un influence négative des JAs sur la tolérance au stress ionique. Primo, par la répression de l'expression du transporteur HAK4 et par conséquent de l'activité d'efflux de Na⁺ dans les racines. Cette fonction de HAK4 dans la tolérance de *aoc*, pourrait être testée génétiquement par l'analyse d'un double mutant *hak4aoc*. Secundo, Les JAs régulent négativement l'activité de détoxification des ROS en réprimant l'expression des enzymes de détoxification FSD1.1 et FSD1.2, une

hypothèse qui nécessiterait également une approche génétique. Tertio, en induisant l'expression de gènes d'activation de la senescence. De plus, la signalisation JAs régule négativement l'accumulation de l'acide gentisique et l'acide citrique, deux métabolites généralement associés à la tolérance au sel chez le Riz (Gupta and De, 2017; Tahjib-Ul-Arif et al., 2021).

Ces influences à la fois positive et négative des JAs sur la tolérance de ces composantes du stress salin rend mieux concevable le débat soutenu quant au rôle négatif ou positif des JAs sur la tolérance du stress salin chez les plantes. En cas de stress salin sévère, avec une forte réduction du potentiel hydrique du sol, la signalisation JAs contribuerait rapidement à réduire les pertes d'eau (composante osmotique) mais, en conditions de salinité moindre, elle favoriserait à long terme l'exacerbation du stress ionique et du stress oxydatif dans les feuilles, causant le déclin des plantes. Néanmoins, une réduction globale des niveaux de JAs chez le Riz pour atténuer cet effet négatif des JAs sur la tolérance du sel serait globalement peu bénéfique au vu de l'importance capitale des JAs dans les réponses de défenses et la fertilité du Riz (Riemann et al., 2013; Cai et al., 2014; Yamada et al., 2012). Il serait dans ce cas intéressant d'élucider les éléments de régulateurs (cis et trans) à travers lesquels les JAs contrôlent l'expression et l'accumulation de ces déterminants moléculaires de la tolérance au stress salin. Cela permettrait probablement, dans le futur, de découpler la signalisation JAs, généralement bénéfique pour la survie et la productivité chez le Riz, des effets indésirables qu'elle entraîne dans la réponse au stress salin.

Chapitre V:

MATERIEL ET METHODES

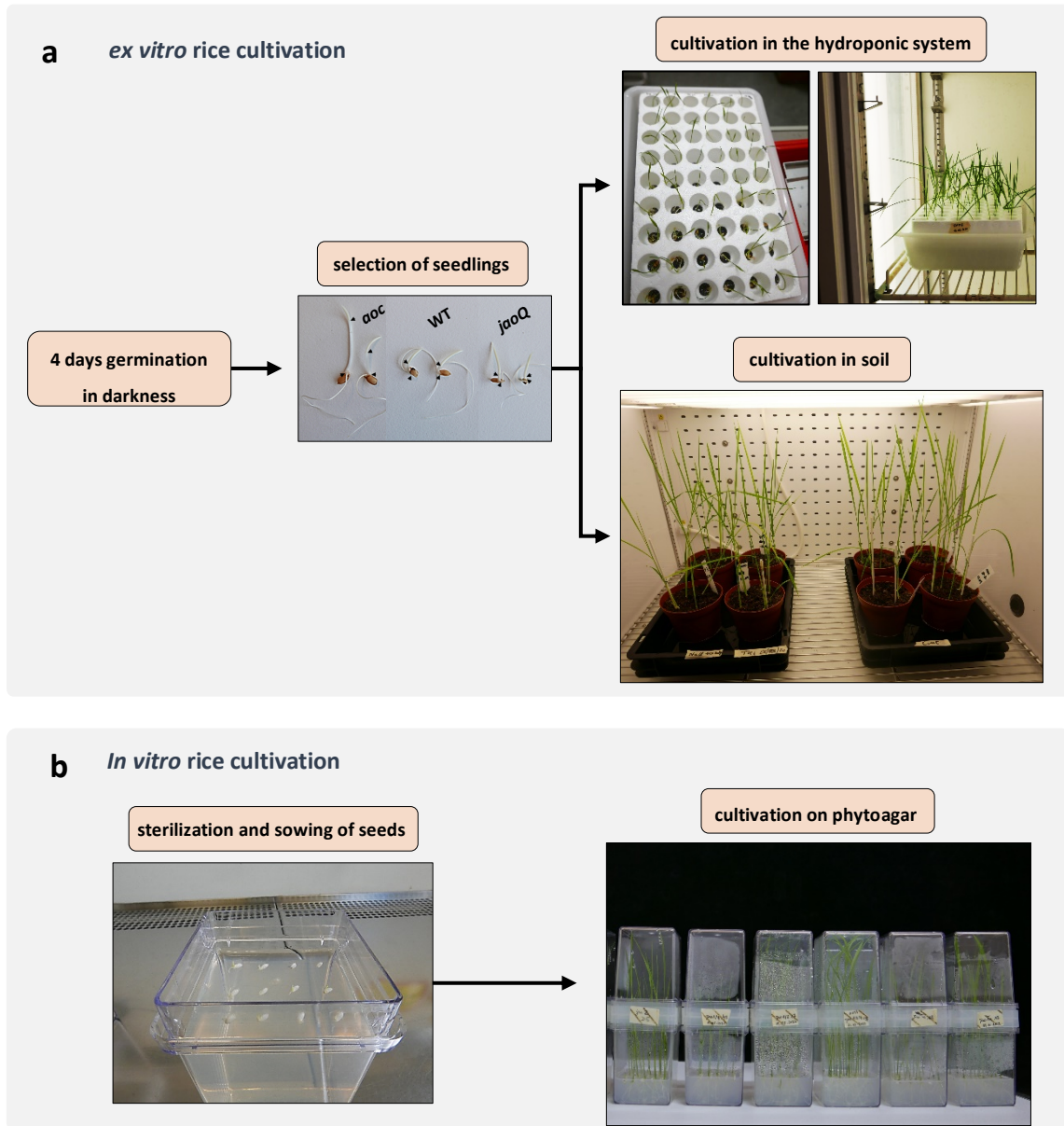


Figure V.1 : Les différents systèmes de culture de Riz utilisé.

a. La culture *ex vitro* commence par une étape de germination à l'obscurité qui permet d'identifier les mutants *aoc* homozygotes. Les mutants *aoc* ainsi que les plantules des autres génotypes sont transférés, suivant les besoins de l'expérience, soit en terre soit en hydroponie. **b.** La culture *in vitro* commence par une étape de stérilisation des graines qui sont ensuite semées et cultivées sur le milieu MS-phyto agar.

1. Les différents génotypes de plantes utilisés et leurs conditions de culture

a. Le Riz

Le cultivar de Riz Kitaake (*Oryza sativa L. ssp. Japonica*) a été fourni par A. Champion (IRD, Montpellier) et utilisé comme plante sauvage pour toutes les expériences réalisées et présentées dans cette thèse. Les mutants *aoc* (Nguyen et al., 2019a) et *jaos* ont été générés chez le fond génétique Kitaake grâce à l'outil d'édition de génome CRISPR-Cas9. Dans tous les systèmes de culture utilisés (hydroponie, *in vitro* et en terre), ces plantes ont été cultivées, quelle que soit l'armoire de culture, avec une photopériode jour/nuit de 12 h/12 h sous une lumière de $\sim 125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une température constante de 28°C.

i. Culture et stress salin en hydroponie

La culture des plantules de Riz en hydroponie a nécessité une étape préalable de germination des graines de 4 jours à l'obscurité (28°C) et ceci, pour deux raisons (Figure V.1.a). La première est que les plantules homozygotes *aoc* doivent être isolées, sur la base de leur mesocotyle très long à l'obscurité (Riemann et al., 2003, 2013; Nguyen et al., 2019a), à partir de la descendance de plantes hétérozygotes *AOC/aoc*. Les mutants homozygotes *aoc* présentent en effet une stérilité mâle du fait de la déficience en Jasmonates. La deuxième raison est que cette étape de germination permet un développement minimal des racines qui facilite le transfert des plantules sur le système hydroponique. Ce dernier consiste en des plaques de polystyrène perforées de trous (diamètre: 1,4 cm sur la face inférieure et 2,4 cm sur la face supérieure). Les plaques sont équipées, sur leur face inférieure, d'une grille en plastique à maillage suffisamment large pour que les racines des plantules puissent traverser la plaque mais suffisamment serré pour retenir la partie aérienne de la plantule à la surface de la plaque, grâce à la graine (Figure V.1.a). Grâce à ce système, les plantules de Riz sont maintenues en suspension lorsque la plaque de polystyrène est placée sur la solution de culture (358 mg L⁻¹ de MS basale - M0221, Duchefa Biochemie - tamponné à pH 5,8 avec 42 mg L⁻¹ de MES - acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique, Duchefa Biochemie). Cela facilite le remplacement de la solution de culture tous les 3 jours, mais surtout l'application du stress salin effectuée en remplaçant la solution de culture par la solution saline (100 mM de NaCl, 358 mg L⁻¹ de MS basal tamponné à pH 5,8 avec 42 mg L⁻¹ de MES). Pour optimiser la croissance des plantules sur ce système hydroponique, l'humidité relative a été fixée à 60 % tout au long des expériences dans les armoires de culture.

ii. Culture en terre et stress abiotiques

La culture des plantes en terre nécessite, pour les mêmes raisons que la culture en hydroponie, une étape préalable de germination des graines issues de plantes *AOC/aoc* pendant 4 jours à l'obscurité (Figure

V.1.a). Les plantules de Riz sont ensuite transférées dans des pots de terre et placées dans les armoires de culture pour quelques jours de croissance supplémentaires.

➤ **Stress salin**

Pour cette expérience de stress salin, pendant les 7 premiers jours après transfert des plantules en terre, les pots sont placés sur des plateaux garnis d'eau pour une hydratation continue puis transférés pendant les 2 jours suivants sur des plateaux secs pour éliminer l'excès d'eau. Après 13 jours de croissance, les plantes sont soumises de façon graduelle au stress salin. Elles sont d'abord transférées sur une solution saline à 100 mM de NaCl puis 5 jours plus tard sur une solution saline à 150 mM de NaCl pour 20 jours de stress supplémentaires avant leur phénotypage.

➤ **La sécheresse**

Pour l'expérience de sécheresse, après transfert des plantules en terre, les pots sont placés sur des plateaux garnis d'eau pour une hydratation continue. Après 4 semaines de croissance, l'hydratation des plantes est arrêtée par leur transfert sur des plateaux secs pour 7 jours de privation d'eau. Le taux d'humidité du terreau est a été mesurée avant et durant la période de privation d'eau grâce à un humidimètre portable HH2 (« Delta-T Devices », <https://delta-t.co.uk/>).

iii. Analyse phénotypique des mutants *jao*

La culture de ces plantes commence par une étape de germination sur milieu phytoagar (0,4 % phyto agar – Duchefa Biochemie - dans du MS à 358 mg L⁻¹ de MS basal - M0221, Duchefa Biochemie - tamponné à pH 5,8 avec 42 mg L⁻¹ de MES – Duchefa Biochemie) (Figure V.1.b). Pour cela, les graines de Riz sont décortiquées et stérilisées en surface par des bains successifs dans de l'éthanol à 70 % (1 min), de l'eau distillée (1 min) et dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant ~3 % de chlore actif (20 min). Ces bains sont suivis de 4 étapes de lavage à l'eau distillée dans des conditions stériles. Les graines sont ensuite semées dans des boîtes Magenta contenant le milieu phyto agar puis incubées dans les armoires de culture. Après 7 jours de culture *in vitro*, les plantules sont transférées sur des pots de terre pour 3 semaines de croissance supplémentaires avant la comparaison de leur phénotype.

b. Arabidopsis

Les génotypes d'*Arabidopsis thaliana* utilisés sont l'écotype Col0 et ont été cultivés avec une photopériode jour/nuit de 16 h, 21°C /8 h, 18°C. *atjao2-2* (GK_870C04, Col0) est un mutant d'insertion d'ADN-T obtenu du Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <https://arabidopsis.info>). Les lignées qui surexpriment les *OsJAOs* de Riz ont été obtenues par transformation génétique (« floral dip », Clough and Bent, 1998) du mutant *atjao2-2* d'*Arabidopsis* avec l'ADN-T du plasmide pEAQΔP19 sur lequel les

ORFs des gènes *OsJAOs* ont été insérés. La culture des plantes d'*Arabidopsis* est initiée sur milieu agar, en conditions stériles, pour sélectionner les plantes T1 *atjao2-2* transformées avec l'ADN-T du plasmide pEAQΔP19 qui code pour le gène *NPTII* de résistance à la kanamycine en plus du gène *OsJAO* intégré. Pour ce faire, les graines sont stérilisées en surface par des bains successifs dans de l'éthanol à 70 % (30 min) et de l'éthanol 100 % (5 min). Une fois sèches, les graines stérilisées sont semées à forte densité puis mises en culture sur milieu agar (0,9 % d'agar, 4,4 g L⁻¹ de MS - M0222, Duchefa Biochemie - tamponné à pH 5,8 avec 500 mg L⁻¹ de MES, kanamycine 100 mg L⁻¹. Après environ 2 semaines de culture, les plantes Kan^R sont transférées individuellement sur des pots en terre et cultivées jusqu'à la production des graines. Au stade de développement jeune rosette des feuilles non stimulées sont prélevées sur 15-20 transformants T1 individuels en vue de l'extraction d'ARN et de l'analyse du phénotype moléculaire par RT-qPCR.

2. Assemblage des constructions plasmidiques :

a. Les vecteurs d'expression des *OsJAOs* chez *Arabidopsis*

Les constructions géniques ayant servi à la surexpression des protéines OsJAOs de Riz chez le mutant *atjao2-2* ont été assemblées par la méthode Golden Gate (GG) dans le plasmide pEAQΔP19-GG (Incarbone et al., 2021), un dérivé du plasmide pEAQ-HT dépourvu du gène *P19* (Figure V.2). L'ADN-T de ce plasmide pEAQΔP19-GG possède deux sites de restriction SapI situés en aval d'un promoteur 35S (p35S). Ces sites SapI permettent l'insertion, par assemblage GG, d'une séquence codante sous forme de module(s) (SapI-ORF-SapI). Grâce au promoteur 35S, la séquence insérée pourra être exprimée de façon constitutive dans les plantes transformées avec l'ADN-T. Pour nos constructions géniques, la séquence codante (ORF) de la protéine fluorescente eGFP est fusionnée aux ORF des gènes *OsJAOs* (sauvages et mutés) de façon à avoir l'ORF des gènes *OsJAOs* en 3' de la *eGFP*. Le module eGFP étant déjà disponible à l'IBMP, seuls les modules OsJAOs ont été produits *de novo*.

A l'exception de l'ORF codant la protéine OsJAO4:p.308T>S (*OsJAO4S*), l'ORF de chacun des gènes *OsJAOs* a été amplifié par PCR depuis les ADN complémentaires (ADNc) produits par rétrotranscription des ARNm des plantes de Riz. Les différentes PCR sont réalisées avec une amorce sens qui couvre une vingtaine de nucléotides en amont du codon initiateur et une amorce antisens qui couvre une vingtaine de nucléotide à partir du codon stop. La séquence *OsJAO4S* a été prédite à partir de la séquence de la protéine OsJAO4:p.308T>S puis synthétisée chimiquement (gBlocks Gene Fragments, <https://eu.idtdna.com>). Elle a ensuite été amplifiée par PCR de la même manière que les ORF des autres gènes. Les sites de restriction SapI ont été greffés aux extrémités 5' et 3' de ces amplicons grâce à une seconde PCR qui utilise des amorces similaires aux premières mais avec le site de restriction SapI comme extensions. Chaque module OsJAO a été assemblé avec le plasmide pEAQΔP19-GG et le module eGFP (disponible sur la plateforme p3P-IBMP) dans une réaction Golden Gate (20 μL) contenant: 100 ng de chaque fragment, 1 μL d'enzyme

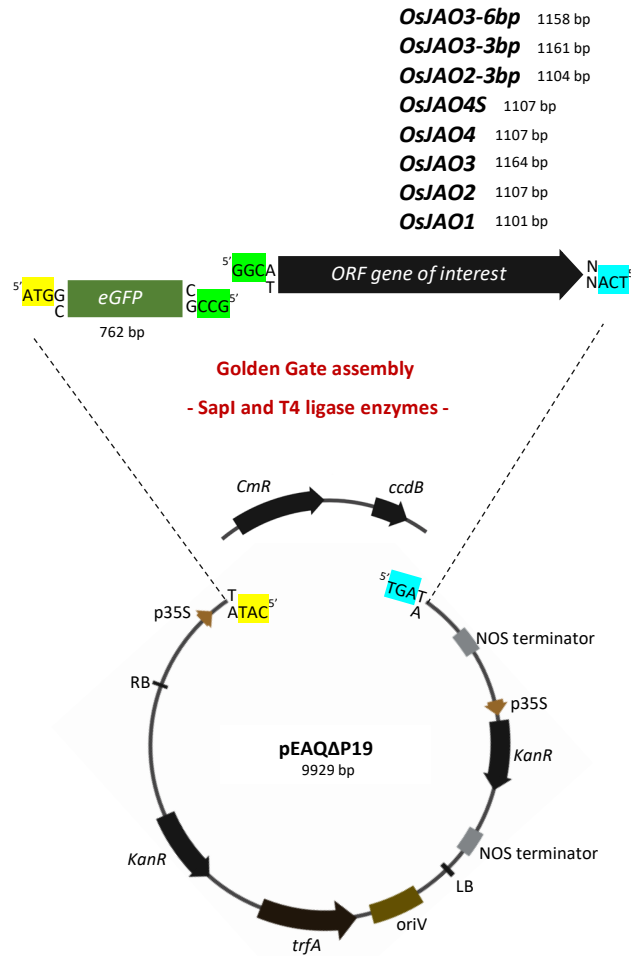


Figure V.2 : Vecteurs d'expression utilisés pour l'expression des protéines OsJAOs fusionnées à l'étiquette eGFP chez le mutant *atjao2-2* d'Arabidopsis.

Le plasmide pEAQΔP19 est assemblé avec l'étiquette eGFP et les ORF des gènes *OsJAOs* par la méthode de clonage Golden Gate. La digestion par l'enzyme de restriction SapI libère des extrémités cohésives sur le plasmide et les différents modules qui sont ensuite rassemblés grâce à la T4 ligase de sorte à avoir les ORF des gènes *OsJAOs* en 3' de l'étiquette eGFP. Le nucléotide N en 3' des ORF des gènes d'intérêt peut être une Adénine (A) ou une Guanine (G) selon la nature du codon stop présent sur l'ORF des *OsJAOs* (TGA, TAG ou TAA).

SapI (NEB), 1 μ L d'enzyme T4 ligase (ThermoFisher), 10 mM ATP et 2 μ L de CutSmart buffer (10X). La réaction est constituée de 6 cycles de digestion (37°C, 10 min) - ligation (18°C, 10 min) suivis d'une étape de désactivation des enzymes à 80°C pendant 10 min. Les milieux réactionnels sont repris pour transformer les bactéries *Escherichia coli* (souche Top10) qui seront ensuite mises en culture et sélectionnées sur la base de leur résistance à la kanamycine conférée par l'intégration des plasmides recombinants pEAQ Δ P19-GG-eGFP-OsJAO* (Figure V.2). La présence de ces plasmides dans les bactéries est par la suite confirmée par PCR. Ils sont ensuite purifiés et leur intégrité vérifiée par séquençage Sanger.

b. Les vecteurs d'expression des OsJAOs dans les bactéries

Les constructions géniques ayant servi à l'expression des protéines recombinantes 6xHis-MBP-OsJAO4 et 6xHis-MBP-OsJAO4:p.308T>S ont été assemblées dans le plasmide pETGG, dérivé du plasmide pET22b(+) (Figure V.3.a). pETGG possède deux sites de restriction SapI, placés devant l'opérateur lac, qui permettent l'intégration d'une séquence codante (ORF) sous forme de module(s) (SapI-ORF-SapI) par assemblage GG. L'insertion d'un ORF devant le répresseur lac permet donc de contrôler son expression que l'on peut induire en ajoutant de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) dans le milieu de culture des bactéries transformées avec le plasmide recombinant. Pour ces vecteurs d'expression bactériens, une étiquette 6xHis-MBP et l'ORF du gène OsJAO4 (ou l'ORF codant pour la protéine OsJAO4:p.308T>S) ont été fusionnées à partir de modules dans le plasmide pETGG, par le même procédé utilisé pour la construction des plasmides recombinants pEAQ Δ P19:eGFP-OsJAO*.

La construction génique ayant servi à l'expression de la protéine recombinante 6xHis-MBP-OsJAO2 a été assemblée par la méthode de clonage Gateway dans le plasmide pHMGWA (Figure V.3.b). Les sites de recombinaison Gateway attB1 et attB2 ont été greffés, respectivement, aux extrémités 5' et 3' des amplicons de l'ORF de OsJAO2 grâce à une réaction PCR qui utilise des amorces similaires à celles utilisées pour l'amplification de l'ORF mais avec les séquences attB comme extensions. Par recombinaison dans une réaction BP, ces amplicons avec les sites attB ont été intégrés dans le plasmide pDONR/Zeo pour donner le plasmide d'entrée pZEO:OsJAO2. Un clone de pZEO:OsJAO2 validé par séquençage est recombinaison avec le plasmide de destination pHMGWA dans une réaction LR pour donner le plasmide d'expression pHMGWA:OsJAO2.

Les constructions plasmidiques ayant servi à l'expression de la protéine recombinante 6xHis-OsJAO1 et 6xHis-OsJAO3 ont également été assemblées par la méthode de clonage Gateway mais dans le plasmide pHGWA (Figure V.3.c). Les constructions ont été générées et fournies par nos partenaires Allemands du KIT.

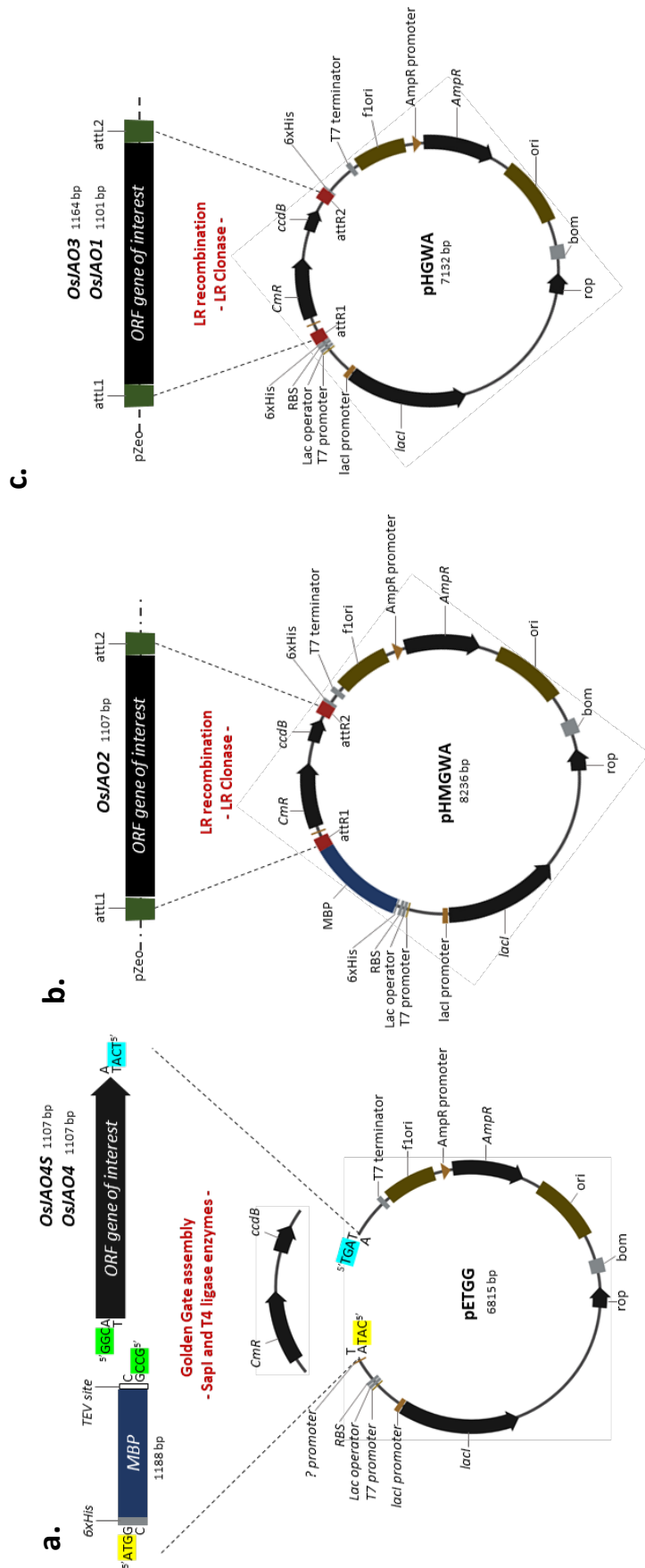


Figure V.3 : Vecteurs d'expression utilisés pour l'expression des protéines OsJAOs fusionnées aux étiquettes 6xHis ou 6xHis-MBP dans les bactéries *E. coli*.

a. Le plasmide pETGG est assemblé avec l'étiquette 6xHis-MBP et l'ORF du gène *OsJAO4S* ou celui du gène *OsJAO4* par la méthode de clonage Golden Gate. La digestion par l'enzyme de restriction SapI libère des extrémités cohésives sur le plasmide et les différents modules qui sont ensuite rassemblés grâce à la T4 ligase de sorte à avoir les ORF des gènes *OsJAOs* en 3' de l'étiquette 6xHis-MBP. b. Le plasmide de destination pHMGWA est recombiné, via une réaction LR, avec le plasmide d'entrée pDONR/ZEO portant l'ORF du gène *OsJAO2* pour former le vecteur d'expression pHMGWA:OsJAO2. c. Les vecteurs d'expression pHMGWA:OsJAO1 et pHMGWA:OsJAO3 sont également assemblés par recombinaison LR du plasmide pHMGWA, avec le plasmide d'entrée pZEO, portant l'ORF du gène *OsJAO1* ou celui du gène *OsJAO3*.

c. Les vecteurs d'expression de la machinerie CRISPR-Cas9 chez le Riz

Nous avons utilisé le plasmide pUbi-Cas9 (fourni par A. Champion, IRD, Montpellier) qui porte déjà sur son ADN-T la séquence codante de l'enzyme Cas9, placée sous le contrôle du promoteur ZmUbi (promoteur du gène Ubi-1 de *Z. mays*) (Figure V.4.a). Ce plasmide porte également des sites de recombinaison attR, de part et d'autre du gène *ccdB*, qui permettent l'insertion des séquences des ARN guides (sgRNAs) et de celles des promoteurs permettant leur expression. L'assemblage de ces sgRNAs a d'abord été effectué sur le plasmide d'entrée pENTR4:gRNA4 qui possède deux promoteurs U6p1 et U6p2 (deux promoteurs différents du gène du petit ARN nucléaire U6 du Riz) qui permettent l'expression de deux sgRNAs différents (Figure V.4.a). En aval du promoteur U6p1 se trouve une séquence de « transactivating CRISPR RNA » ou tracrRNA (aussi appelé gRNA scaffold) précédée de 2 sites de restriction BtgZI. Ces sites permettent l'insertion d'un « CRISPR RNA » ou crRNA (partie du sgRNA spécifique du gène cible) qui sera fusionné au tracrRNA pour reformer le premier sgRNA. En aval du promoteur U6p2, se trouve un deuxième tracrRNA précédé de 2 sites de restriction BsaI permettant l'insertion d'un autre crRNA et la formation d'un deuxième sgRNA. Les crRNAs utilisés pour la mutagenèse des gènes OsJAOs ont été minutieusement choisis grâce au programme en ligne CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). Leur insertion dans le plasmide pENTR4:gRNA4 et leur transfert sur le plasmide pUbi-Cas9 ont été réalisés sur la base des protocoles décrits par Zhou et al. (2014) et Xie et al. (2015).

i. Assemblage du vecteur pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1

crRNA8-OsJAO1 et crRNA9-OsJAO1 ont été utilisés pour cibler le gène *OsJAO1* (Figure V.4.b). crRNA9-OsJAO1 a été inséré en premier. Il a d'abord été assemblé par hybridation des amorces crRNA9-OsJAO1_fw et crRNA9-OsJAO1_rv longues de 24 nucléotides (nt) et complémentaires sur les 20 nt de leur extrémité 3' qui correspondent à la séquence du crRNA9-OsJAO1. Les 4 nt en 5' de ces amorces sont complémentaires aux extrémités cohésives que génère le clivage de pENTR4:gRNA4 par l'enzyme BsaI. De par son insertion entre les sites BsaI, crRNA9-OsJAO1 est placé sous le contrôle du promoteur U6p1 et forme, avec le tracrRNA en aval du promoteur, le sgRNA9-OsJAO1. Le plasmide formé, dénommé pENTR4:sgRNA9-OsJAO1, est utilisé par la suite pour y insérer crRNA8-OsJAO1 entre les sites BtgZI. crRNA8-OsJAO1 est assemblé de la même manière que le crRNA9, par hybridation des amorces complémentaires crRNA8-OsJAO1_fw et crRNA8-OsJAO1_rv. Les 4 nucléotides en 5' de ces deux dernières amorces sont, quant à eux, complémentaires aux extrémités cohésives que génère le clivage de pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 par l'enzyme BtgZI. De par son insertion entre les sites BtgZI, crRNA8-OsJAO1 est placé sous le contrôle du promoteur U6p1 et forme, avec le tracrRNA en aval du promoteur, le sgRNA8. Le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 devient ainsi pENTR4:sgRNAs-OsJAO1. L'étape suivant l'assemblage du plasmide pENTR4:sgRNAs-OsJAO1 devait consister à transférer facilement les sgRNAs dans le plasmide pUbi-Cas9 par recombinaison LR. Pour des raisons non élucidées, nous n'avons

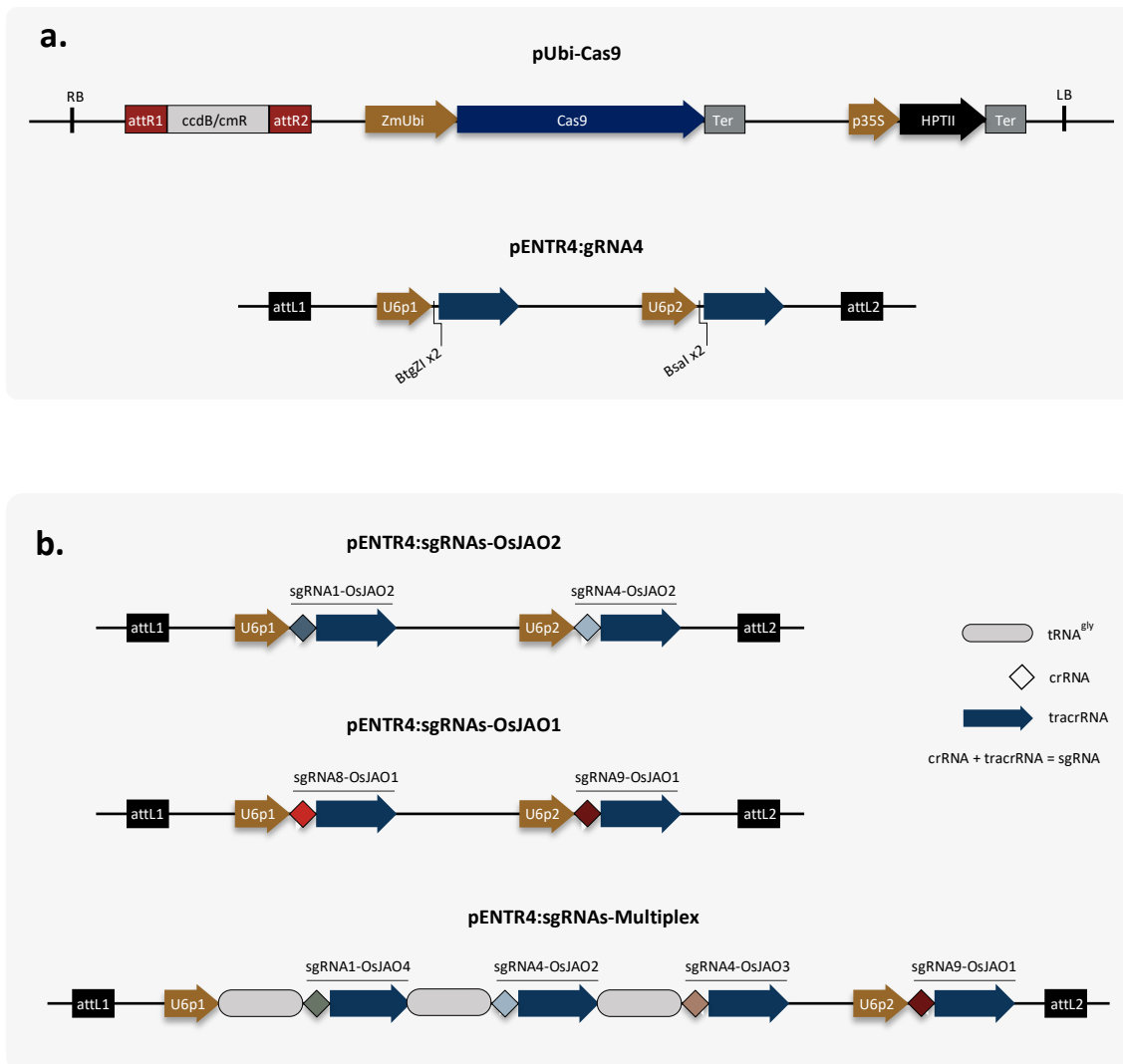


Figure V.4 : **Constructions plasmidiques utilisées pour l'expression de l'enzyme Cas9 et des sgRNAs chez le Riz pour la production des mutants *jaos*.**

a. Le plasmide binaire pUbi-Cas9 et le plasmide d'entrée pENTR4:gRNA4 utilisés pour l'assemblage des vecteurs d'expression pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1 et pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2 et pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex. pENTR4:gRNA4 possède deux couples de sites de restrictions BtgZI et BsaI respectivement devant les promoteurs U6p1 et U6p2 qui permettent, par assemblage Golden Gate, de fusionner des crRNAs avec les tracrRNAs présents devant ces sites de restriction pour former des sgRNAs. C'est grâce aux sites de recombinaison attL et attR présents respectivement sur pENTR4:gRNA4 et pUbi-Cas9 que les vecteurs d'expression sont assemblés par une réaction LR. **b.** pENTR4:sgRNAs-OsJAO2, pENTR4:sgRNAs-OsJAO1 et pENTR4:sgRNAs-Multiplex portent les sgRNAs qui ont été intégrés, par LR, au plasmide binaire pUbi-Cas9 pour générer les trois vecteurs d'expression utilisés pour la production des mutants *jaos*.

pu recombinaison pENTR4:sgRNAs-OsJAO1 avec pUbi-Cas9. Comme alternative, nous avons amplifié et transféré la construction assemblée sur le plasmide pENTR4:sgRNAs-OsJAO1 dans le plasmide d'entrée pENTR1A. C'est la recombinaison du pENTR1A:sgRNAs-OsJAO1 néoformé avec le plasmide pUbi-Cas9 qui a permis de générer le vecteur pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1.

ii. Assemblage du vecteur pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2 :

crRNA1-OsJAO2 et crRNA4-OsJAO2 ont été utilisés pour cibler le gène *OsJAO2* (Figure V.4.b). Nous avons utilisé le même procédé que celui qui a permis l'assemblage du plasmide pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1. Dans le cas présent, le crRNA1-OsJAO2 a été placé sous le contrôle du promoteur U6p1 et crRNA4-OsJAO2 sous le contrôle du promoteur U6p2.

iii. L'assemblage du vecteur pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex :

Un crRNA a été utilisé pour cibler chacun des 4 gènes *OsJAOs* (Figures IV.3.b & IV.4). Le gène *OsJAO1* est ciblé par crRNA9-OsJAO1 présent également sur le plasmide pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1, le gène *OsJAO2* ciblé par crRNA4-OsJAO2 aussi présent sur pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2 et les gènes *OsJAO3* et *OsJAO4* sont ciblés respectivement par crRNA4-OsJAO3 et crRNA1-OsJAO4 dans les deux cas. Pour faciliter l'assemblage des sgRNAs, j'ai réutilisé le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 dans lequel le sgRNA9-OsJAO1 est déjà assemblé devant le promoteur U6p2. Les sgRNAs des gènes OsJAO1, OsJAO2 et OsJAO3 seront assemblés dans ce plasmide sous forme d'une séquence polycistronique suivant une méthode de multiplexage proposée récemment par Xie et al. (2015). Cette méthode consiste à alterner des sgRNAs avec la séquence de l'ARN de transfert glycine (tRNA^{gly}) dans une séquence polycistronique afin que celle-ci, une fois exprimée, puisse être reconnue et clivée par la machinerie de maturation des tRNA et provoquer ainsi la libération des sgRNAs dans les cellules de la plante. Dans le cas présent, le tRNA^{gly} a été alterné avec les sgRNAs des gènes OsJAO1, OsJAO2 et OsJAO3 pour former le Multiplexe tRNA^{gly}-sgRNA1-OsJAO4-tRNA^{gly}-sgRNA4-OsJAO2-tRNA^{gly}-sgRNA4-OsJAO3 qui est assemblé par GG en aval du promoteur U6p1 du plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1, grâce aux sites de restriction BtgZI (Figure V.5).

Le Multiplexe de sgRNAs est synthétisé sous forme de trois modules A, B et C qui sont ensuite assemblés avec le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 par la méthode de clonage Golden Gate. La formation de ces modules a nécessité la synthèse préalable du fragment tracrRNA-tRNA^{gly} qui a été utilisé comme matrice pour la synthèse ultérieure des modules A, B et C.

Synthèse du fragment tracrRNA-tRNA^{gly} (Figure V.5.a) : D'abord le fragment tRNA^{gly} est amplifié par PCR grâce à l'amorce sens 3'_tracrRNA-tRNA_fw (54 nt) dont les 15 premiers nt en 5' correspondent à l'extrémité 3' du tracrRNA et les 39 nt en 3' correspondent à l'extrémité 5' du tRNA^{gly}. L'amorce antisens

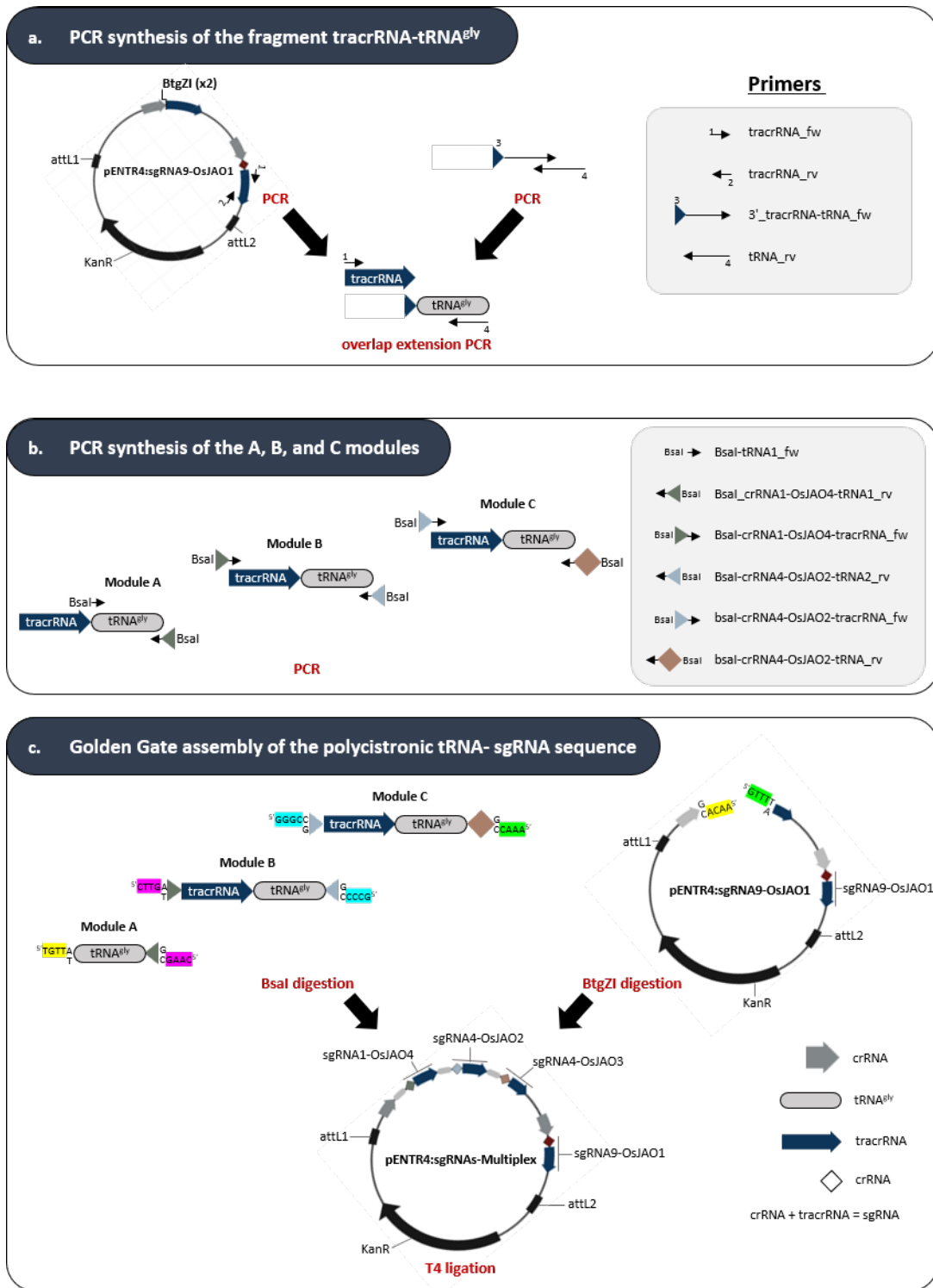


Figure V.5 : Procédé d'assemblage de la séquence polycistronique de sgRNAs dans le plasmide pENTR4:sgRNAs-Multiplex.

a. Une première série de PCR permet d'amplifier le tracrRNA depuis le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 et le tRNA^{gly} grâce à deux amorces qui couvrent la totalité de sa séquence. Les fragments tracrRNA et tRNA^{gly} sont assemblés via une « overlap extension PCR » pour donner le fragment tracrRNA-tRNA^{gly}. Celui-ci est utilisé comme matrice de PCR pour la synthèse des modules A, B et C (b.). Grâce aux sites de restriction BsaI présents sur les modules A, B et C et aux sites de restriction BtgZI présents sur le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1, ces fragments d'ADN sont assemblés via une réaction Golden Gate en présence des enzymes de restrictions BtgZI, BsaI et de la T4 ligase (c.). Adaptée de Xie et al. 2015.

tRNA_{rv} est longue de 60 nt et couvre exclusivement l'extrémité 3' du tRNA^{gly}. Les deux amorces sont complémentaires sur les 16 nt de leur extrémité 3' permettant de générer par PCR une chimère d'ADN avec le tRNA^{gly} fusionné en 5' avec 15 nt du tracrRNA. La séquence complète du tracrRNA est également amplifiée par les amorces tracrRNA_{fw} et tracrRNA_{rv} en utilisant comme matrice le plasmide pENTR4:sgRNA4. Les fragments tracrRNA et la chimère de tRNA^{gly} sont assemblés via une « overlap extension PCR » avec une amorce sens spécifique à l'extrémité 5' du tracrRNA et l'amorce antisens spécifique à l'extrémité 3' du tRNA^{gly}. Grâce à la séquence de 15 nt commune aux deux fragments, la PCR produit une nouvelle séquence recombinante tracrRNA-tRNA^{gly}.

Les modules A, B et C sont synthétisés de sorte à ce que, après digestion avec l'enzyme de restriction BsaI, l'extrémité 3' du plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 (digéré par BtgZI) soit complémentaire avec l'extrémité 5' du module A, l'extrémité 3' du module A complémentaire avec l'extrémité 5' du module B, l'extrémité 3' du module B complémentaire avec l'extrémité 5' du module C (3' crRNA4-OsJAO2-tRNA^{gly}) et enfin que l'extrémité 3' du module C soit complémentaire avec l'extrémité 5' du plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 (Figures V.5.b-c).

Synthèse du Module A : il est composé, de 5' en 3', de la séquence du tRNA^{gly} et par la moitié du crRNA1-OsJAO4 (**tRNA^{gly}-(5')crRNA1-OsJAO4**). Il est synthétisé par PCR grâce à l'amorce sens BsaI-tRNA1_{fw} (28 nt) dont les 15 derniers nt en 3' correspondent à l'extrémité 5' du tRNA^{gly} et sur les 13 autres nt, se trouve le site de restriction de BsaI qui génère une extrémité cohésive 5'TGTT3' en 5' du module A. L'amorce antisens BsaI_crRNA1-OsJAO4-tRNA1_{rv} comprend 36 nt dont les 15 derniers nt en 3' correspondent à l'extrémité 3' du tRNA^{gly} et sont précédés, sur l'amorce, des 12 nt de l'extrémité 5' du crRNA1-OsJAO4. En 5' de l'amorce antisens se trouve le site de restriction BsaI qui permet de générer une extrémité cohésive 3'GAAC5' en 3' du module A. Le Module A est donc généré par PCR grâce à ces deux amorces et la matrice tracrRNA-tRNA^{gly}.

Synthèse du Module B : il est composé, de 5' en 3', de la moitié 3' du crRNA1-OsJAO4, du fragment tracrRNA-tRNA^{gly} et de la moitié 5' du crRNA4-OsJAO2 (**(3')crRNA1-OsJAO4-tracrRNA-tRNA^{gly}-(5')crRNA4-OsJAO2**). Il est synthétisé grâce à l'amorce sens BsaI-crRNA1-OsJAO4-tracrRNA_{fw} (36 nt) dont les 15 derniers nt en 3' correspondent à l'extrémité 5' du tracrRNA et sont précédés sur l'amorce des 12 nt de l'extrémité 3' du crRNA1-OsJAO4. En 5' de l'amorce sens se trouve le site de restriction BsaI qui permet de générer une extrémité cohésive 5'CTTG3' en 5' du module B. L'amorce antisens BsaI-crRNA4-OsJAO2-tRNA2_{rv} comprend 36 nt dont les 15 derniers nt en 3' correspondent à l'extrémité 3' du tRNA^{gly} et sont précédés, sur l'amorce, des 12 nt de l'extrémité 5' du crRNA4-OsJAO2. En 5' de l'amorce antisens se trouve le site de restriction BsaI qui permet de générer une extrémité cohésive 3'CCCG5' en 3' du module B. Le Module B est donc généré par PCR grâce à ces deux amorces et la matrice tracrRNA-tRNA^{gly}.

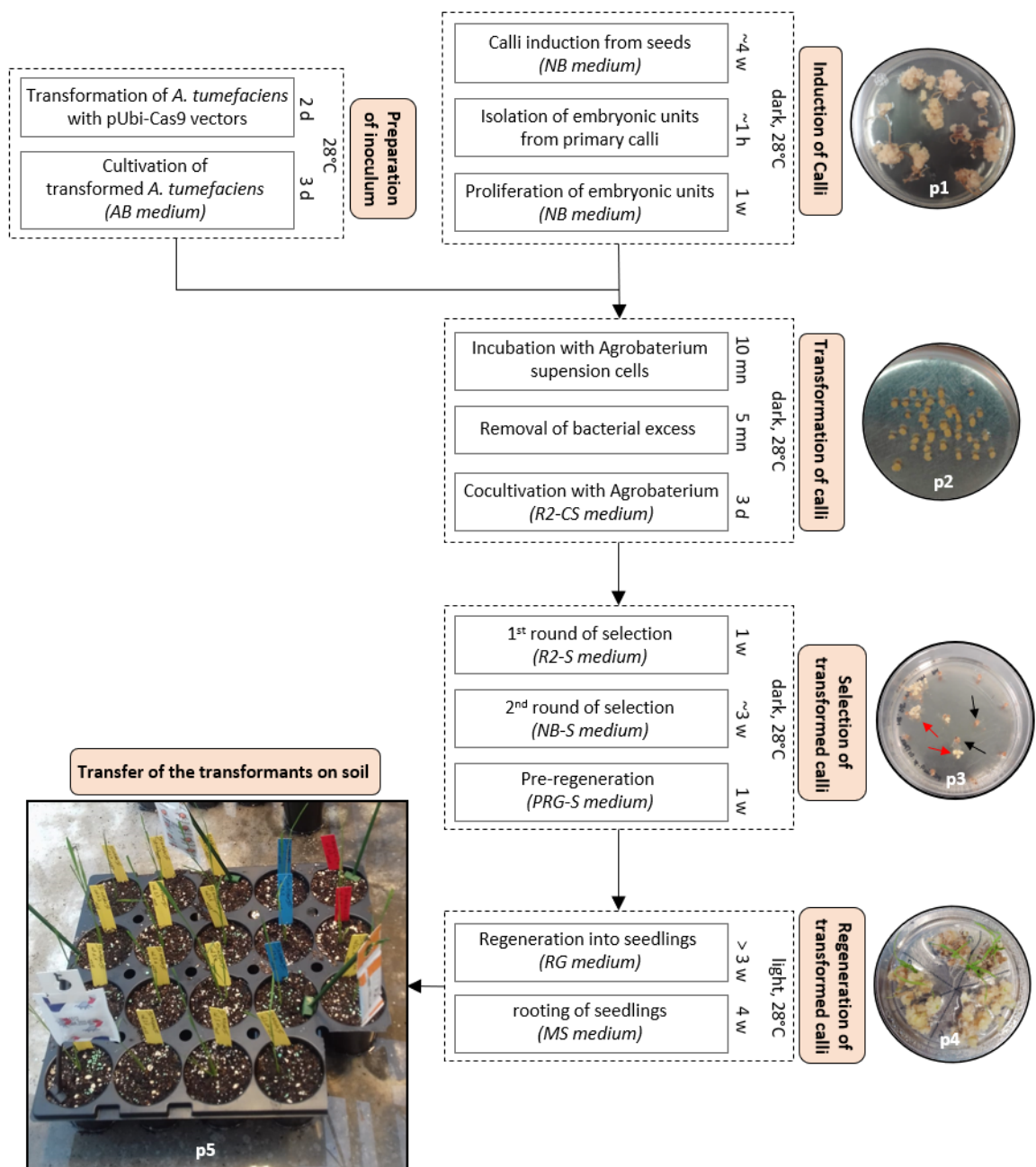


Figure V.6 : **Chronologie des étapes de transformation génétique du Riz.**

Les flèches noires représentées sur l'image p3 (picture 3) indiquent les cals bruns non transformés qui dégénèrent à cause de leur sensibilité à l'hygromycine. Les flèches rouges indiquent les cals blancs transformés qui sont insensibles à l'hygromycine. w : week (semaine) ; d : day (jour) ; h : hour (heure) ; mn : minute. adaptée de Hiei and Kamori, 2008.

Synthèse du Module C : il est composé, de 5' en 3', de la moitié 3' du crRNA4-OsJAO2, du fragment tracrRNA-tRNA^{gly} et du crRNA4-OsJAO3 (^(3')crRNA4-OsJAO2-tracrRNA-tRNA^{gly}-crRNA4-OsJAO3). Il est synthétisé grâce à l'amorce sens BsaI-crRNA4-OsJAO2-tracrRNA_fw (36 nt) dont les 15 derniers nt en 3' correspondent à l'extrémité 5' du tracrRNA et sont précédés, sur l'amorce, des 12 nt de l'extrémité 3' du crRNA4-OsJAO2. En 5' de l'amorce sens se trouve le site de restriction BsaI qui permet de générer une extrémité cohésive 5'GGGC3' en 5' du module C. L'amorce antisens BsaI-crRNA4-OsJAO2-tRNA_rv comprend 48 nt dont les 15 dernier nt en 3' correspondent à l'extrémité 3' du tRNA^{gly} précédés des 20 nt du crRNA4-OsJAO3. En 5' de l'amorce antisens se trouve le site de restriction BsaI qui permet de générer une extrémité cohésive 3'CAAA5' en 3' du module C. Le Module C est donc généré par PCR grâce à ces deux amorces et la matrice tracrRNA-tRNA^{gly}.

Une fois les modules A, B et C synthétisés, ils sont digérés avec l'enzyme de restriction BsaI et assemblés grâce à l'enzyme T4 ligase avec le plasmide pENTR4:sgRNA9-OsJAO1 (digéré au préalable par BtgZI) pour former le plasmide pENTR4:sgRNAs-Multiplex (Figure V.5.c). Ce dernier ne pouvant être recombiné avec le plasmide pUbi-Cas9, les sgRNAs générés ont donc été transférés dans le pENTR1A. C'est donc la recombinaison par LR du pENTR1A-sgRNAs-Multiplex néoformé avec pUbi-Cas9 qui a produit le plasmide pUbi-Cas9-sgRNAs-Multiplex utilisé pour la production des mutants multiples.

3. Transformation génétique des plantes

a. Transformation des plantes d'Arabidopsis :

La transformation des mutants *atjao2-2* a été effectuée par la méthode « floral dip » sur la base du protocole décrit par Clough et Bent (1998). Pour ce faire, des bactéries *A. tumefaciens* (souche GV3101) transformées avec les plasmides pEAQΔP19:OsJAO* ont été mises en culture à 28 °C sur une nuit dans 50 ml milieu de culture LB complété avec les antibiotiques rifampicine (0,5 mg mL⁻¹) et Kanamycine (0,1 mg mL⁻¹). Les bactéries ont été collectées par centrifugation (15 min, 11 000 g) et remises en suspension dans 200 ml d'une solution de sucrose 5 %, contenant également 0,05% de Silvet L-77 et 200 μM d'acétoxyringone. Les inflorescences des plantes ont été trempées dans la suspension de bactéries pendant 30 secondes. Les plantes ont été conservées dans l'obscurité pendant 24 h avant d'être transférées dans des conditions normales de culture pour la production des graines.

b. Transformation du Riz

La transformation génétique du Riz est réalisée sur des cals embryogènes sur la base du protocole décrit par Hiei et Komari (2008) (Figure V.6, Tableaux V.1 & V.2). En résumé, les bactéries *A. tumefaciens* (souche EHA105) transformées avec les constructions plasmidiques pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1, pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2 et pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex sont mises en co-culture avec des cals pour

NB stock solutions																			
Macroelements N6 (1 L ; 20 X)	KNO ₃	56.6 g																	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	9.26 g																	
	KH ₂ PO ₄	8 g																	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.3 g																	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g																	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	758 mg																	
	H ₃ BO ₃	300 mg																	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg																	
	KI	75 mg																	
Macroelements B5 (1 L ; 100 X)	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 mg																	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 mg																	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5 mg																	
	Na ₂ EDTA	3.72 g																	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g																	
	Nicotinic acid	100 mg																	
Vitamins B5 (1 L ; 100 X)	Pyroxin-HCl	100 mg																	
	Thiamin-HCl	1 g																	
R2 stock solutions																			
Macroelements R2-I (1 L ; 10 X)	KNO ₃	40 g																	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.3 g																	
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3.12 g																	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.46 g																	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.46 g																	
Macroelements R2-II (1 L ; 10 X)	MnSO ₄ ·H ₂ O	160 mg																	
	H ₃ BO ₃	283 mg																	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	220 mg																	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	12.5 mg																	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	19.5 mg																	
Microelements R2 (100 mL ; 1000 X)	Na ₂ EDTA	0.177 g																	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.25 g																	
	Thiamin-HCl	40 mg																	
Fer-EDTA R2 (1 L ; 100 X)																			
Vitamins R2 (1 L ; 40 X)																			
AB stock solutions																			
AB buffer (1 L ; 20 X)																			
AB salts (1 L ; 20 X)																			

Tableau V.1 : Composition des solutions stocks qui ont servi à la préparation des différents milieux de culture utilisés lors de la transformation des cals de Riz

provoquer le transfert de l'ADN-T dans le génome de certaines cellules des cals. Les nouveaux cals transformés sont ensuite sélectionnés pour leur résistance à l'Hygromycine conférée par le gène *HPTII* présent sur l'ADN-T puis régénérés en plantules pour constituer la génération T0 des plantes transgéniques. Le détail des étapes de la transformations des cals de Riz est décrit dans les lignes suivantes.

i. Induction des cals embryogènes

Les graines de Riz sont décortiquées et stérilisées en surface par des bains successifs dans de l'éthanol à 70 % (1 min), de l'eau distillée (1 min) et dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant ~3 % de chlore actif (20 min), suivis de 4 étapes de lavage à l'eau distillée dans des conditions stériles. Les graines sont ensuite semées sur le milieu d'induction NB (en boîte Optilux 100 x 20mm) à raison de 10 graines par boîte. Les graines sont mises en culture pendant 3-4 semaines à l'obscurité, à 28°C pour induire la formation de cals. Du sculetum des graines se forme donc un cal primaire duquel se détachent des nodules sphériques et compacts de 0,5 à 1 mm de diamètre. Ceux-ci sont transférés sur un nouveau milieu NB pour une semaine supplémentaire de culture.

ii. Transformation des bactéries *A. tumefaciens*

Les plasmides pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO1, pUbi-Cas9:sgRNAs-OsJAO2, pUbi-Cas9:sgRNAs-Multiplex assemblés sont intégrés dans les bactéries *A. tumefaciens* (souche EHA105) par électroporation. 4 jours avant la transformation des cals, un clone des bactéries transformées est remis en culture dans 2 mL de milieu LB pendant 16h, à 28°C, sous agitation. 200 µL de la culture sont ensuite étalées sur du milieu de culture d'Agrobacterium (AB) solide et incubées pendant 3 jours à 28°C.

iii. Coculture des cals avec les bactéries transformées

Le jour de la transformation, les bactéries incubées depuis 3 jours sont re-suspendues dans 30 mL de milieu R2-CL à raison d'une DO_{600nm} de 0,1. Dans une boîte de pétri, la suspension bactérienne est incubée pendant 10 mn (sous légère agitation) avec une trentaine de cals minutieusement choisis sur la base de leur taille (3-5 mm), de leur forme (sphérique), de leur couleur (jaune pâle et opaque) et de leur texture (compact et résistant sous la pince). Les cals sont ensuite passés plusieurs fois sur du papier Whatman stérile pour éliminer le surplus de bactéries. Ils sont enfin mis en culture sur du milieu de coculture R2-CS et incubés à 25°C, à l'obscurité pendant 3 jours.

iv. Sélection des cals transformés

Au bout des 3 jours de coculture, les cals sont transférés sur un milieu sélectif R2-S contenant notamment de l'hygromycine (pour l'ADN-T) et de la vancomycine (contre les bactéries) pour deux semaines de culture à l'obscurité, à 28 °C. Après deux semaines de sélection, les cals résistants à l'hygromycine sont repérés par leur couleur blanche (contrairement à la couleur brune des cals nécrosés) et transférés sur un deuxième milieu de sélection et de prolifération NB-S pour 2-3 semaines supplémentaires à l'obscurité.

v. Régénération des cals transformés

Après la sélection des cals transformés, ceux-ci sont transférés sur un milieu de pré-régénération (PRN) contenant notamment de l'auxine (ANA) et de la cytokinine (BAP) et incubés pendant une semaine à l'obscurité. Ensuite, les cals qui réagissent correctement (texture toujours blanche) à la présence des hormones sont transférés sur le milieu de régénération (RN). Ceux-ci sont incubés 2 jours à l'obscurité (28 °C) puis 3 semaines en lumière (28°C) au bout desquels les cals forment des tiges et des feuilles vertes. Ils sont ensuite transférés en tube sur du milieu MS (sans hormone) pour une période 4 semaines de développement et d'enracinement puis, les jeunes plantes transgéniques sont transférées en terre.

4. Le génotypage des mutants CRISPR-Cas9

L'objectif ultime du génotypage des mutants générés avec l'outil de mutagenèse CRISPR-Cas9 était d'identifier des plantes dépourvues de l'ADN-T des plasmides pUbi-Cas9 (Cas9-free) mais qui présentent des mutations pouvant induire l'inactivation (ko) des gènes cibles. La première étape consistait à identifier, parmi les plantes transgéniques régénérées des cals (T0), celles qui présentent des mutations sur les gènes cibles. C'est dans la descendance de celles-ci, en T1 et en T2, que nous avons recherché les plantes « Cas9-free » et ko pour les gènes *OsJAOs* ciblés. Plusieurs méthodes d'analyse ont été utilisées pour le génotypage de ces plantes. Tout d'abord, l'ADN extrait des plantes a été soumis à une analyse PCR pour vérifier la présence (en T0) ou l'absence (en T1 et T2) de l'ADN-T dans le génome des plantes puis, l'ADN des plantes intéressantes a été soumis à une analyse HRM pour identifier les plantes qui présentent des mutations sur les gènes. La nature des mutations induites est révélée par séquençage de type Sanger. Lorsque la mutation est de type hétérozygote, une analyse des chromatogrammes générés par séquençage par l'outil ICE-Synthego (Conant et al., 2022) est nécessaire pour distinguer les différents allèles présents sur le locus concerné.

a. Extraction de l'ADN

Une feuille par plante a été utilisée pour l'extraction de leur ADN. Celles-ci, placées sur des plaques de 96 échantillons, sont d'abord broyées à sec au « TissueLyser II » à l'aide de billes en acier. Elles sont

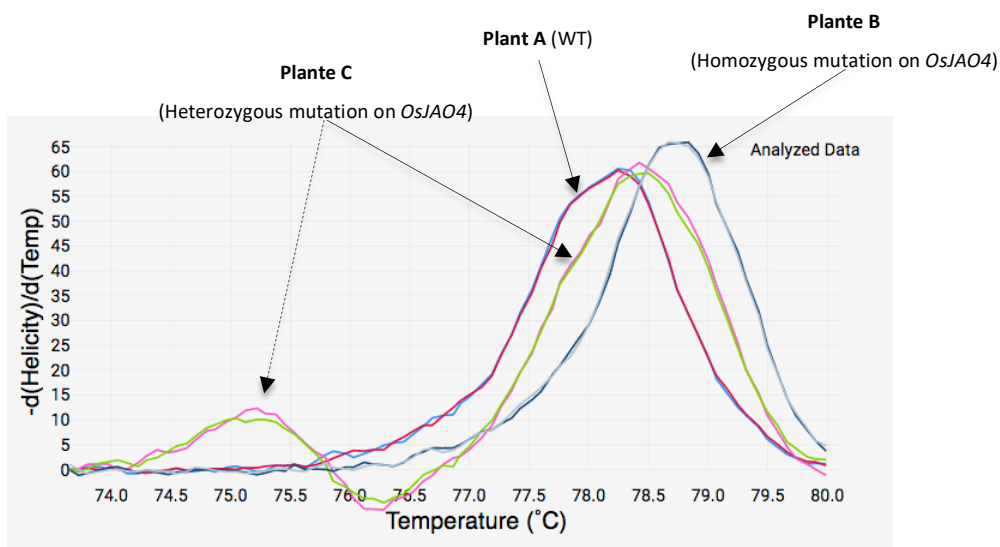


Figure V.7 : **Génotypage par la méthode HRM du site de mutation du gène *OsJAO4* d'une plante sauvage et deux mutants de Riz.**

Les courbes de fusions des amplicons du Locus ciblé sur le gène *OsJAO4* ont été extraites après une réaction HRM et analysée sur le programme en ligne uAnalyze. Les mutations induites sur le locus *OsJAO4* des mutants modifient également les propriétés physico-chimiques des séquences se révélant par des profils de courbes de fusion différents de celui de la plante sauvage.

broyées une deuxième fois en présence de 500 µL de tampon Edwards (250 mM de Tris HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 25 mM d'EDTA, 0,5% de SDS). Les débris cellulaires sont ensuite sédimentés par centrifugation (vitesse maximale, 10 mn, à température ambiante). 100 µL du surnageant de ces extraits cellulaires sont repris et mélangés avec 75 µL d'isopropanol pour précipiter l'ADN. Après centrifugation (vitesse maximale, 15 mn, à température ambiante), le culot d'ADN a été lavé une fois avec de l'éthanol 70% puis dissout dans 50 µL d'eau distillée.

b. Vérification de la présence/absence de l'ADN-T

La présence de l'ADN-T sur le génome des plantes est vérifiée grâce à une PCR multiplex sur laquelle deux couples d'amorces ont été utilisés. Le premier couple est constitué des amorces pUbi-Cas9_rv et pUbi-Cas9_fw qui sont spécifiques du transgène *Cas9* présent sur l'ADN-T. Le deuxième couple est constitué des amorces sn182-OsJAO1_fw et sn182-OsJAO1_rv qui sont spécifiques du gène *OsJAO1*. L'utilisation de ces deux couples d'amorces dans une même réaction PCR permet d'abord de valider la qualité de l'ADN génomique (ADNg) dans la réaction assemblée et au-delà, de déterminer si une copie de l'ADN-T des vecteurs pUbi-Cas9 est présente dans cet extrait d'ADNg.

c. Identification des mutants par analyse HRM

Du fait du nombre important de plantes que nous avons à génotyper, surtout sur les générations T1 et T2, le séquençage direct des différents loci aurait été très coûteux. Comme alternative, nous avons analysé ces loci par « High Resolution Melting » (HRM), une méthode d'analyse post-PCR en temps réel qui permet de générer des courbes de fusion très résolutive de façon à détecter des variations nucléotidiques sur des séquences ADN. Pour chacun des sites ciblés sur les gènes *OsJAOs*, un couple d'amorces a été dessiné de part et d'autre du site de mutation. La taille des amplicons est comprise entre 60 à 100 pb. La réaction d'HRM a été effectuée dans le LightCycler 480 (Roche) dans un milieu réactionnel de 10 µL composé de 250 nM de chacune des deux amorces, 5 µL du kit HRM « precision melt supermix » (BIORAD) et 3 µL d'extrait d'ADNg. L'analyse des courbes de fusions générées est effectuée en utilisant le logiciel GeneScanning (ROCHE) ou l'application en ligne uAnalyze (<https://www.dna.utah.edu/ua/uanalyze.html>). En guise d'exemple, les profils des courbes de fusion obtenues après analyse par HRM du site de mutation du gène *OsJAO4* de trois plantes différentes sont illustrées sur la Figure V.7. Pour chaque plante, la réaction est réalisée en duplicata, d'où la présence de courbes juxtaposées. A est une plante sauvage utilisée comme référence. Elle présente un pic unique de température de fusion vers 78,4° C. La plante B présente également un pic unique de température de fusion mais décalé de celui du WT. Cela révèle une différence dans la composition de la séquence de la plante A comparée à la plante B. La plante C présente deux pics de température de fusion (vers 75,2° C et vers 78,5° C) révélant la présence de deux allèles différents du gène *OsJAO3* sur cette plante.

d. Révélation des mutations par Séquençage Sanger

Cette étape du génotypage ne peut être réalisée directement sur l'ADNg extrait des plantes. Elle requiert d'abord l'amplification d'une région d'environ 400 paires de bases autour du site de mutation à travers une PCR réalisée avec une ADN polymérase à haute-fidélité (de type Phusion DNA Polymerase). Les produits PCR sont ensuite purifiés et soumis à un séquençage Sanger avec les mêmes amorces utilisées que celles utilisées pour leur amplification. Lorsque le locus analysé est une séquence sauvage ou muté de façon homozygote, le chromatogramme obtenu permet une lecture facile des nucléotides qui composent la séquence. Dans le cas de mutations hétérozygotes, le mélange des séquences de nature différentes crée un chevauchement des chromatogrammes qui rend difficile la lecture des séquences. Le programme ICE-Synthego (Conant et al., 2022) permet de déchiffrer ces chromatogrammes et de déterminer les différents allèles représentés dans le locus concerné.

5. Test de l'activité JA Oxidase *in vitro*

a. Expression hétérologue des protéines OsJAOs dans les bactéries

Les bactéries *Escherichia coli* de souche Rosetta 2 transformées avec les plasmides pHGWA:OsJAO1, pHMGWA:OsJAO2, pHGWA:OsJAO3, pETGG:6xHis-HMP-OsJAO4 et pETGG:6xHis-HMP-OsJAO4 ont d'abord été mises en culture à 37° C dans un milieu LB jusqu'à l'obtention d'une A_{600nm} entre 0,45 et 0,5. L'expression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG dans les milieux de culture incubés pour cette étape à 20° C pour 4 h. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation (20 mn, 4500 rpm, 4° C) et les culots bactériens congelés. L'expression des protéines a été analysée par « Western Blot » grâce à un anticorps anti-His produit chez la souris qui est lui-même ciblé par un anticorps « Goat anti-mouse » couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) qui, en présence du substrat luminol, émet une luminescence qui peut être détectée avec le système de camera Fusion FX (<https://www.vilber.com>).

Pour les tests d'activité JAO réalisés avec les protéines purifiées, les culots bactériens collectés ont été remis en suspension dans du tampon de lyse (NaCl 300 mM, imidazole 20 mM et Tris-HCl 50 mM pH 7,5) pour atteindre 20 unités de DO mL⁻¹. Les bactéries ont ensuite été lysées par sonication (VibraCell™ 75115, Bioblock Scientific) et les débris cellulaires éliminés par centrifugation (15 min, 17 000 rpm, 4°C). Le lysat clarifié a par la suite été filtré puis les protéines d'intérêt purifiées par chromatographie d'affinité sur un système FPLC (fast protein liquid chromatography) Äkta pure (GE Healthcare Life Sciences) de type cation métallique-chélat (IMAC pour « immobilized metal affinity chromatography »). Pour ce faire, le lysat a été chargé sur une phase stationnaire HisTrap FF crude 1 mL (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon constitué de 95 % de solution de lavage (Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM et glycérol 5 %) et 5 % de solution d'élution (Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, glycérol 5 % et imidazole 500 mM). Les protéines avec l'étiquette 6xHis ont ensuite été éluées avec la solution d'élution. La présence des protéines

d'intérêt dans les fractions éluées a ensuite été analysée par gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie ou par Western blot. la concentration protéique des éluats a été estimée par quantification avec le réactif de Bradford en utilisant une gamme de calibration de BSA (bovine serum albumine).

Concernant les tests enzymatiques réalisés directement avec les lysats bactériens, les culots collectés ont été remis en suspension dans du tampon ne contenant pas d'imidazole (NaCl 300 mM, DTT 5 mM et Tris-HCl 50 mM pH = 7,5) pour la lyse des bactéries par sonication (VibraCell™ 75115, Bioblock Scientific). Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par centrifugation (15 mn, 17 000 rpm, 4° C) et les lysats clarifiés collectés pour les tests enzymatiques.

b. Assemblage du milieu réactionnel et analyse des produits obtenus

i. Test d'activité avec les enzymes purifiées

Pour chacun des tests réalisés, un volume correspondant à 10 µg de protéine purifiée a été utilisé. Il est rajouté à un milieu réactionnel de 200 µL constitué de 100 µM de substrat JA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 13,3 mM 2-OG, 13,3 mM d'ascorbate, 0,67 mM FeSO₄ et 200 µg de BSA. Les milieux réactionnels ont été incubés à 30° C pendant 1h au bout de laquelle ils ont été acidifiés avec 20 % (v/v) d'HCl (1 M). Les produits de la réaction ont par la suite été extraits avec le même volume (240 µL) d'acétate d'éthyle. Le mélange a été vortexé et centrifugé (5 min, 11 000 g, 4° C) puis, 200 µL de la phase supérieure organique ont été transférés et séchés sous flux d'azote avant de reprendre les composés extraits dans 150 µL de méthanol pur. Les extraits méthanoliques ont été analysés par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) pour la détection du JA et de sa forme oxydée produit par les JAOs.

ii. Test d'activité avec le lysat clarifié

Ces tests ont été réalisés avec un volume de 150 µL du lysat clarifié. Pour chaque protéine ce volume est rajouté à un milieu réactionnel (volume final 300 µL) constitué de 30 µM de substrat JA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT, 50 mM 2-OG, 50 mM d'ascorbate, 0,67 mM FeSO₄ et 15 µg de BSA. Les milieux réactionnels ont ensuite été incubés à 30°C pendant 1h puis les produits de la réaction extraits et analysés suivant le même procédé que celui utilisé après les tests enzymatiques avec les protéines purifiées.

6. Analyses des séquences protéiques

Les séquences protéiques des 2-ODDs de *Picea abies* utilisées dans la classification phylogénétique des JAOs de Riz et l'étude de leur séquence ont été extraites depuis le portail « PlantGenIE »

(<https://plantgenie.org/>). Les séquences des 2-ODDs de toutes les autres espèces ont, quant à elles, été extraites depuis le portail de génomique comparative « Phytozome » (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Le logiciel « MEGA-X » (Tamura et al., 2021) a ensuite été utilisé pour l'exploitation de ces séquences et celles des JAOs. L'alignement multiple des séquences a été effectué avec la méthode « Muscle » et l'arbre phylogénétique dressé avec la méthode « Maximum likelihood ».

7. Analyse métabolomique non ciblée

a. Extraction des métabolites

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour l'extraction des métabolites :

- La méthode utilisée pour les échantillons de feuilles des *jao* (partie aérienne des plantules de 9 jours) (Figures II.20-21) et les racines des plantes soumises au sel (Figures III.8-10) a été adaptée du protocole décrit dans Widemann et al. (2013). Entre 30 et 70 mg de poudre fine congelée du matériel végétal ont été extraits avec différentes solutions de méthanol (MeOH) contenant de 0,5 % l'acide acétique et des standards internes. Les feuilles des *jao* ont été extraits en présence de 12 $\mu\text{L mg}^{-1}$ de MeOH 80% (1 μM de dehydro JA-Ile, 100 nM de D₆-ABA et 100 nM de PG-A1) et les racines des plantes soumises au sel en présence de 8 $\mu\text{L mg}^{-1}$ de MeOH 70% (3 μM de D-ABA). Les échantillons ont été homogénéisés dans la solution d'extraction au « Precellys Evolution » (Bertin Technologies, France) en présence de billes de verre dans des tubes à bouchon vissant de 2 ml (2 cycles de 30 sec à 6500 rpm séparés de 30 sec de repos). Après 1 h d'incubation à 4°C sur une roue rotative, les débris cellulaires ont été sédimentés par centrifugation (10 min, 11 000 g, 4° C) et 120 μL du surnageant transférés dans les vials prévus pour l'analyse métabolomique non ciblée. Il est important de préciser que les extraits méthanoliques des feuilles des *jao* ont également servi pour le dosage des JAs (Figure II.18) par UPLC-MS/MS (Figure II.18).
- L'extraction des métabolites des feuilles des plantes soumises au stress salin (Figures III.8-10) a été réalisée en plusieurs étapes. Pour chaque échantillon, 40 à 60 mg de poudre fine congelée ont été additionnés de 300 μL de MeOH 100% et 20 μL de ribitol, utilisé comme standard interne, en présence de billes de verre dans des tubes à bouchon vissant de 2 ml. Le broyage se fait au « Precellys Evolution » comme précédemment. L'homogénat a été incubé sous agitation à 70° C pendant 10 min. Après 10 min de repos sur la paillasse, il est additionné de 200 μL de chloroforme et homogénéisé au vortex. Le nouveau mélange a ensuite été incubé sous agitation à 37° C pendant 5 min. Il a été complété avec 350 μL d'eau et homogénéisé au vortex. Le nouvel homogénat a enfin été centrifugé (10 min, 11 000 g, 4° C) et 100 μL de la phase méthanolique

(supérieure) contenant le composés « médio-polaires » transférés dans un vial en vue de l'analyse métabolomique.

b. Analyses des métabolites

L'analyse non ciblée des métabolites a été effectuée sur le système UHPLC UltiMate 3000 (Thermo) couplé au Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) à haute résolution ImpactII (Bruker). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 µm, Waters) couplée à une pré-colonne Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 5 mm, 1,7 µm, Waters). Les données brutes extraites de ces analyses ont été traitées avec le logiciel MetaboScape 4.0 (Bruker) : les caractéristiques moléculaires ont été prises en compte et regroupées dans des « buckets » contenant un ou plusieurs adduits et isotopes des ions détectés avec leur temps de rétention et les informations MS/MS lorsqu'elles sont disponibles. Les paramètres utilisés pour la définition des « buckets » sont : un seuil d'intensité minimale de 10 000, une longueur de pic minimale de 4 spectres, un rapport signal/bruit (S/N) de 3 et un seuil de coefficient de corrélation fixé à 0,8. Les ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ ont été autorisés comme ions primaires possibles. Les répliques biologiques d'une même condition (ou génotype) ont été regroupés et seuls les « buckets » trouvés dans 80% des échantillons d'un groupe ont été extraits des données brutes. La liste obtenue a été annotée à l'aide de « SmartFormula » pour générer une formule brute basée sur la masse exacte des ions primaires et le modèle isotopique. La variation maximale autorisée sur la masse ($\Delta m/z$) a été fixée à 3 ppm, et la valeur maximale de mSigma (évaluant la conformité des modèles isotopiques) a été fixée à 30. Pour attribuer un nom aux formules obtenues, des listes d'analytes ont été dérivées de FooDB (<http://foodb.ca>), KNApSackK (<http://www.knapsackfamily.com/KNApSackK/>), PlantCyc (<https://plantcyc.org/>), PhenolExplorer (<http://phenol-explorer.eu/>), NPA et une librairie spectrale interne (PIMS-IBMP). Les paramètres utilisés pour l'annotation avec les listes d'analytes sont les mêmes que pour l'annotation SmartFormula. L'analyse statistique a été réalisée avec MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metabonalyt.ca>) avec 9 échantillons par groupe (5 pour l'analyse métabolique sur les feuilles des *jaos*) en utilisant les surfaces des pics comme unité de référence. Les données ont été normalisées par la somme avant transformation logarithmique et mise à l'échelle de Pareto. Les composés ont été considérés comme statistiquement différentiels entre deux groupes en utilisant les seuils de p-value $\leq 0,01$ et de fold change ≥ 2 ou ≤ -2 .

8. Analyses statistiques

Pour toutes les données présentées sur le projet JAO, le test de Student (t-test) a été utilisé pour évaluer les différences entre les moyennes des mesures faites sur les mutants *jaos* et les plantes sauvages (WT).

9. Nomenclature des variants protéiques exprimés chez les mutants *jaos*

Tous les variants protéiques correspondants aux gènes *OsJAOs* avec des indels dans les différents mutants *jao* ont été nommés selon les règles de nomenclature des variants de la Human Genome Variation Society (HGVS) (Escande and Rouleau, 2015). Voici quelques exemples d'annotations :

- **Substitution**

OsJAO3:p.61PD>H : sur ce variant OsJAO3 la proline (P) et l'acide aspartique (D) en position 61 sont remplacés par une histidine (H).

- **Délétion**

OsJAO3:p.DG62del : sur ce variant OsJAO3 on a la délétion de l'acide aspartique (D) et la glycine (G) en position 62.

- **Décalage cadre de lecture**

OsJAO3:p.V55Gfs*20 : sur ce variant OsJAO3 la valine (V) est le premier acide aminé changé, en position 55, en glycine (G) ; la taille du segment en aval est de 20 acide aminés, codon stop (*) inclus

- **Décalage cadre de lecture + Délétion**

OsJAO2:p.K155Vfs*7&21_34del : sur ce variant OsJAO2 la lysine (K) est le premier acide aminé changé, en position 155, en valine (V) ; la taille du segment en aval est de 7 acide aminés, codon stop (*) inclus. De plus on a une délétion des acides aminés situés entre les positions 21 et 34.

10. Méthodes décrites dans le manuscrit Ndecky et al. (chapitre III)

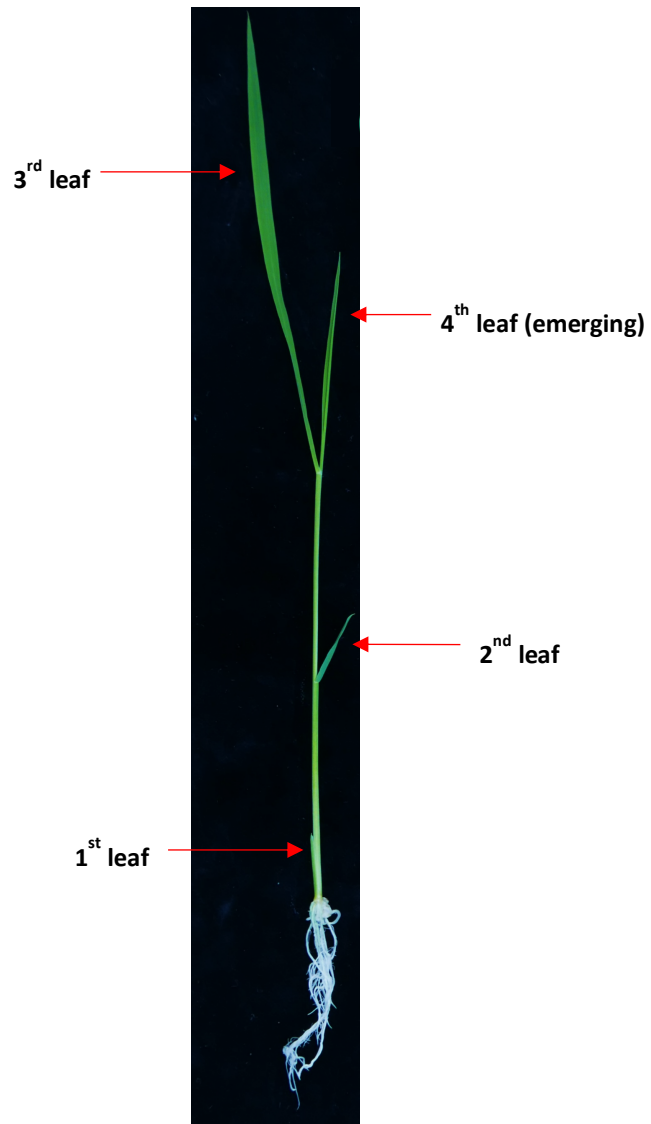
- Extraction et dosage des hormones
- Extraction des ARN et analyse d'expression des gènes
- Evaluation de la sénescence des feuilles par la mesure de la fuite d'électrolyte
- Mesure de la teneur en eau relative (RWC) des feuilles
- Révélation du Peroxyde d'hydrogène par coloration DAB
- Quantification de la chlorophylle
- Quantification des teneurs en ions Na⁺ et K⁺

primer name	primer sequence (5'->3')	gene ID	target
Assembly of the plasmids pUbi-Cas9 and pENTR4:gRNA4			
crRNA8_OsJAO1_fw	TGTTGCCAAGAGCCCGCCAAATAC	Os01g0832600	OsJAO1
crRNA8_OsJAO1_rv	AAACGTATTGGCCGGCTCTTGG		
crRNA9_OsJAO1_fw	GTGTGGGTTGCTGTACGCGAGCCTG		
crRNA9_OsJAO1_rv	AAACCAGGCTCGCTGACAGCAACC		
crRNA1_OsOsJAO2_fw	TGTTGTCCGGCCTCAGTACCCGGTC	Os05g0127500	OsJAO2
crRNA1_OsOsJAO2_rv	AAACGACCGGTACGTGAGGCCGGA		
crRNA4_OsOsJAO2_fw	GTGTGGGAGGTGGGGCCACTTGTG		
crRNA4_OsOsJAO2_rv	AAACCACAAGTGGCCCCACCTCCC		
3' tracrRNA-tRNA_fw	GCACCGACTCGGTGCAACAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTG	-	tracrRNA-tRNA ^{glv} fragment
tRNA_rv	CTGCCATGCACCAGCCGGGAATCGAACCCGGGTCTGTACCGTGGCAGGGTACTATTCTAC		
tracrRNA_fw	GGAGACCGAGGTCTCGGTTTTAGAGCTAGAAATA		
tracrRNA_rv	GCACCGACTCGGTGCCAC		
Bsal-tRNA1_fw	GAGGTCTCTTGTAAACAAGCACCAGTG	-	Polycistronic tRNA-sgRNA sequence
Bsal-crRNA1_OsJAO4-tRNA2_rv	TAGGTCTCCCAAGCGTCTAATGCACCAGCCGGGAA		
Bsal-crRNA1_OsJAO4-tracrRNA_fw	TAGGTCTCCCTTGATCTCCCTGTTTTAGAGCTAGAA		
Bsal-crRNA4_OsJAO2-tRNA3_rv	CGGGTCTCCGCCACCTCCCTGCACCAGCCGGGAA		
Bsal-crRNA4_OsJAO2-tracrRNA_fw	TAGGTCTCCGGGCCACTTGTGTTTTAGAGCTAGAA		
Bsal-crRNA4_OsJAO2-tRNA_rv	CGGGTCTCCAAACCGTCCGGCATGACATGCTGCACCAGCCGGGAA		
Assembly of the plasmids pHGWA, pEAQ and pETGG			
sn77-OsJAO1_Sapl-fw	TAAGCTCTTCGGGCATGGCGGACTGCATG	Os01g0832600	OsJAO1
sn78-OsJAO1_Sapl-rv	TAAGCTCTTCGTCATTATTCTGTTGTTTTGGGTGATTGA		
sn21-OsJAO2_attB1-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGCGGAGGCGGCGGG	Os05g0127500	OsJAO2
sn22-OsJAO2_attB2-rv	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTATTGAGTGGTGGTAGTAGAATTAGGTAT		
sn81-OsJAO2_Sapl-fw	TAAGCTCTTCGGGCATGGCGGAGGC		
sn82-OsJAO2_Sapl-rv	TAAGCTCTTCGTCATTATTGAGTGGTGGTAGTAGAA	Os03g0289800	OsJAO3
sn79-OsJAO3_Sapl-fw	TAAGCTCTTCGGGCATGAGCAGCTGCTCA		
sn80-OsJAO3_Sapl-rv	TAAGCTCTTCGTCAGTACGCGAGCTAGACTGCTC	Os11g0437800	OsJAO4
sn70-OsJAO4_Sapl-fw	TAAGCTCTTCGGGCATGGACACCAGCGCAA		
sn72-OsJAO4_Sapl-rv	TAAGCTCTTCGTCATCAGTGCACCTTGTCTTC	-	OsJAO4S
sn170-OsJAO4S_Sapl-fw	TAAGCTCTTCGGGCATGGACACCACAGCAT		
sn171-OsJAO4S_Sapl-rv	TAAGCTCTTCGTCATCAGTGCACCTTACTG		
Genotyping of the <i>jaos</i> mutants			
pUbi-Cas9_rv	ACGACAATCTGATCCAAGCT	-	T-DNA_pUbi-Cas9
pUbi-Cas9_fw	GTCACGCTGCACTGCAGGCA		
sn195-OsJAO1_HRM-fw	GAGTACGGGAGAGAGGTGAT	Os01g0832600	OsJAO1
sn196-OsJAO1_HRM-rv	CGAACGCCTCCTGGAAAC		
sn180-OsJAO1_Seq-fw	GGAGAAGCAGAAGTACGCCAA		
sn181-OsJAO1_Seq-rv	CATGCACATGGCAAAAGCTAAA		
sn182-OsJAO1_Seq-fw	TGCCATATTAGTTTAGCGCATTAA		
sn183-OsJAO1_Seq-rv	CACCGCGGGTAGTAGTTGG	Os05g0127500	OsJAO2
sn176-OsJAO2_Seq-fw	AGTGGCTAGCTGAGTGATCG		
sn177-OsJAO2_Seq-rv	GTGGATGAGTGATGTGTACCTGA		
sn193-OsJAO3_HRM-fw	GGCCTGAACAATATCCCGGT	Os03g0289800	OsJAO3
sn194-OsJAO3_HRM-rv	TTCACCGCCTGGAAGAAACC		
sn178-OsJAO3_Seq-fw	GCGAGTGCATGACGTGCTA		
sn207-OsJAO3_Seq-rv	TGCATATACAAATTGCGGCGG		
sn191-OsJAO4_HRM-fw	TCTCCTTGACTGGGGTGACT	Os11g0437800	OsJAO4
sn192-OsJAO4_HRM-rv	TGGCCACTTGTATGACGCGCT		
sn174-OsJAO4_Seq-fw	TGCCCTAGAGATGGAGGAGA		
sn175-OsJAO4_Seq-rv	ATCTCGCCAAATTAAGTTGAGGTTT		

Annexe V-1 : Liste des amorces utilisées

primer name	primer sequence (5'->3')	gene ID	target
RT-qPCR			
JAZ9_fw	TTGATGACTTCCCAGCTGAGAA	Os03g0180800	OsJAZ9
JAZ9_rv	GCGCTGTGGAGGAACTCTTG		
MYC2_fw	TGGACGTGTACCATGCCAG	Os10g0575000	OsMYC2
MYC2_rv	GCTGGTCTGCGAGTAGAC		
OslIS_rv	TGCAAGATTTGGCTCGAGGT	Os02g0121700	OslIS
OslIS_fw	CAGAGGGTTACTCAGCCTGC		
OsTPS30_fw	GGGCTCGAGTGAAGTACCAG	Os08g0167800	OsTPS30
OsTPS30_rv	AGGTGTTTATCTCAGTCTCGT		
RBB12-2_fw	GAGATGGTGGACTCGTGGTC	Os01g0123900	OsRBB12-2
RBB12-2_rv	AGTTGTGCATTTAGGTGTGC		
UBQ5_fw	ACCACCTCGACCGCCACTACT	Os01g0328400	OsUBQ5
UBQ5_rv	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT		
UBQ10_fw	GAGCCTCTGTTCTCAAGTA	Os02g0161900	OsUBQ10
UBQ10_rv	ACTCGATGGTCCATTAACC		
sn5-OsJAO1_qPCR-fw	GTCGGCGACCAGATTGAG	Os01g0832600	OsJAO1
sn6-OsJAO1_qPCR-rv	AGAGTGCGAGCGAGATGC		
sn3-OsJAO2_qPCR-fw	GGCGACCAAATTCAGGTG	Os05g0127500	OsJAO2
sn4-OsJAO2_qPCR-rv	GAAGGTCGCGATCGACAG		
sn382-OsJAO3_qPCR-fw	ATCACCGTCGACCCTGTTC	Os03g0289800	OsJAO3
sn383-OsJAO3_qPCR-rv	CGTTGCTCAGCACCTGTATCT		
sn231-OsJAO4_qPCR-fw	GGAGATCAAGCGTCGTAACA	Os11g0437800	OsJAO4
sn232-OsJAO4_qPCR-rv	AGCGACATGGCTTTGAGTAG		
PDF1.2_fw	CACCCTTATCTTCGCTGCTCTT	AT5G44420	AtPDF1-2
PDF1.2_rv	TACACTTGTGTGCTGGGAAGAC		
EXP_qPCR-fw	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC	At4g26410	AtEXP
EXP_qPCR-rv	GGTCCGACATACCCATGATCC		
TIP41_qPCR-fw	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	At4g34270	AtTIP41
TIP41_qPCR-rv	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA		

Annexe V-2 : Liste des amorces utilisées (suite)



Annexe V-3 : Annotation des différentes feuilles d'une plantule de Riz âgées de 13 jours.

Bibliographie

- Abouelsaad, I. and Renault, S.** (2018). Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant *def-1* exposed to NaCl stress. *J. Plant Physiol.* **226**: 136–144.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., and Genschik, P.** (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **19**: 1188–1193.
- Adio, A.M., Casteel, C.L., de Vos, M., Kim, J.H., Joshi, V., Li, B., Juéry, C., Daron, J., Kliebenstein, D.J., and Jandera, G.** (2011). Biosynthesis and defensive function of N δ -Acetylornithine, a jasmonate-induced arabidopsis metabolite. *Plant Cell* **23**: 3303–3318.
- Agriculture, U.S.D. of** (2022). Grain : World Markets and Trade.
- Ahmad, R.M., Cheng, C., Sheng, J., Wang, W., Ren, H., Aslam, M., and Yan, Y.** (2019). Interruption of jasmonic acid biosynthesis causes differential responses in the roots and shoots of maize seedlings against salt stress. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.
- Akbar, M. and Yabuno, T.** (1977). Breeding for saline-resistant varieties of rice. IV. Inheritance of delayed-type panicle sterility induced by salinity. *Japanese J. Breed. Ikushugaku Zasshi*: 237–240.
- Al-Shiblawi, F.** (2017). Adaptation des plantes à la salinité : caractérisation de variants écotypiques et de lignées invalidées pour des systèmes de transport de NA⁺ chez le Riz.
- Alamgir, A. and Ali, M.Y.** (1999). Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh J. Bot.* **28**: 145–149.
- Aldridge, D.C., S. Galt, S., Giles, D., and Turner, W.B.** (1971). Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Chem. Soc. C Org.*
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* (80-.). **285**: 1256–1258.
- Aravind, L. and Koonin, E. V** (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* **2**: 8.
- Aslam, M., Qureshi, R.H., and Ahmed, N.** (1993). A rapid screening technique for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* **150**: 99–107.
- Assembly, T.G.** (2015). United Nations General Assembly Resolutions. *Antarct. Int. Law* **15900**: 1–35.
- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., and Heitz, T.** (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *J. Exp. Bot.* **66**: 3879–3892.

- Autona, M., Rösgeb, J., Sinevb, M., Holthauzenc, L.M.F., and Bolenc, D.W.** (2011). Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. *Biophys. Chem.* **23**: 1–7.
- Barberon, M. and Geldner, N.** (2014). Radial transport of nutrients: The plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiol.* **166**: 528–537.
- Benito, B., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A.** (2012). HAK transporters from *Physcomitrella patens* and *Yarrowia lipolytica* mediate sodium uptake. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1117–1123.
- Berthomieu, P. et al.** (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **22**: 2004–2014.
- Biswas, K.K., Neumann, R., Haga, K., Yatoh, O., and Iino, M.** (2003). Photomorphogenesis of rice seedlings: A mutant impaired in phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth. *Plant Cell Physiol.* **44**: 242–254.
- Bolaños, J.A. and Longstreth, D.J.** (1984). Salinity Effects on Water Potential Components and Bulk Elastic Modulus of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Plant Physiol.* **75**: 281–284.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., Van Den Dries, N., and Maurel, C.** (2005). Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* **139**: 790–805.
- Brady, S.F. and Clardy, J.** (2004). Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from bromeliad tank water. *J. Nat. Prod.* **67**: 1283–1286.
- Buckler IV, E.S., Thornsberry, J.M., and Kresovich, S.** (2001). Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genet. Res.* **77**: 213–218.
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N.R., de Vries, M., Zeilmaier, T., Van Wees, S.C.M., Schuurink, R.C., and Van den Ackerveken, G.** (2017). Arabidopsis JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 6388–6393.
- Cai, Q., Yuan, Z., Chen, M., Yin, C., Luo, Z., Zhao, X., Liang, W., Hu, J., and Zhang, D.** (2014). Jasmonic acid regulates spikelet development in rice. *Nat. Commun.* **5**: 3476.
- Campbell, M.T., Bandillo, N., Al Shiblawi, F.R.A., Sharma, S., Liu, K., Du, Q., Schmitz, A.J., Zhang, C., Véry, A.A., Lorenz, A.J., and Walia, H.** (2017). Allelic variants of OsHKT1;1 underlie the divergence between indica and japonica subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content.
- Campos, M.L., Kang, J.-H., and Howe, G.A.** (2014). JASMONATE-TRIGGERED PLANT IMMUNITY. *J. Chem. Ecol.* **23**: 1–7.
- Cao, L., Tian, J., Liu, Y., Chen, X., Li, S., Persson, S., Lu, D., Chen, M., Luo, Z., Zhang, D., and Yuan, Z.**

- (2021). Ectopic expression of OsJAZ6, which interacts with OsJAZ1, alters JA signaling and spikelet development in rice. *Plant J.* **108**: 1083–1096.
- Cao, X., Wu, L., Wu, M., Zhu, C., Jin, Q., and Zhang, J.** (2020). Abscisic acid mediated proline biosynthesis and antioxidant ability in roots of two different rice genotypes under hypoxic stress. *BMC Plant Biol.* **20**: 1–14.
- Cassan, O., Lèbre, S., and Martin, A.** (2021). Inferring and analyzing gene regulatory networks from multi-factorial expression data: a complete and interactive suite. *BMC Genomics* **22**: 1–15.
- Cha-Um, S., Supaibulwatana, K., and Kirdmanee, C.** (2007). Glycinebetaine accumulation, physiological characterizations and growth efficiency in salt-tolerant and salt-sensitive lines of indica rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) in response to salt stress. *J. Agron. Crop Sci.* **193**: 157–166.
- Chang, J., Cheong, B.E., Natera, S., and Roessner, U.** (2019). Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **144**: 427–435.
- Chen, X., Zhang, X., Jia, A., Xu, G., Hu, H., Hu, X., and Hu, L.** (2016). Jasmonate mediates salt-induced nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Divers.* **38**: 118–123.
- Chen, Y., Wang, Y., Huang, J., Zheng, C., Cai, C., Wang, Q., and Wu, C.-A.A.** (2017). Salt and methyl jasmonate aggravate growth inhibition and senescence in *Arabidopsis* seedlings via the JA signaling pathway. *Plant Sci.* **261**: 1–9.
- Chen, Z.X., Wu, J.G., Ding, W.N., Chen, H.M., Wu, P., and Shi, C.H.** (2006). Morphogenesis and molecular basis on naked seed rice, a novel homeotic mutation of OsMADS1 regulating transcript level of AP3 homologue in rice. *Planta* **223**: 882–890.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.
- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A.M., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina, J.M., and Solano, R.** (2018). An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **14**: 171–178.
- Chun, H.J., Baek, D., Cho, H.M., Lee, S.H., Jin, B.J., Yun, D.J., Hong, Y.S., and Kim, M.C.** (2019). Lignin biosynthesis genes play critical roles in the adaptation of *Arabidopsis* plants to high-salt stress. *Plant Signal. Behav.* **14**: 1–4.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Conant, D., Hsiau, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., Yang, J., Joshi, S., Kelso, R., Holden, K.,**

- Enzmann, B.L., and Stoner, R.** (2022). Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *Cris. J.* **5**: 123–130.
- Cowling, R.J. and Harberd, N.P.** (1999). Gibberellins control Arabidopsis hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *J. Exp. Bot.* **50**: 1351–1357.
- Dathe, W., Rönch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., and Schreiber, K.** (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*: 530–535.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., and Tester, M.** (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* **30**: 497–507.
- Demidchik, V.** (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* **109**: 212–228.
- Demidchik, V. and Maathuis, F.J.M.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signalling and development. *New Phytol.* **175**: 387–404.
- Demidchik, V. and Tester, M.** (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **128**: 379–387.
- Demole, E., Lederer, E., and Mercier, D.** (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **45**: 675–685.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., and Klessig, D.F.** (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arab. B.* **9**: e0156.
- Deng, C., Ye, H., Fan, M., Pu, T., and Yan, J.** (2017). The rice transcription factors OsICE confer enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **12**: 2–6.
- Deng, H., Liu, H., Li, X., Xiao, J., and Wang, S.** (2012). A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiol.* **158**: 876–889.
- Dhakarey, R., Kodackattumannil Peethambaran, P., and Riemann, M.** (2016). Functional analysis of jasmonates in rice through mutant approaches. *Plants* **5**: 267–281.
- Dhakarey, R., Raorane, M.L., Treumann, A., Peethambaran, P.K., Schendel, R.R., Sahi, V.P., Hause, B., Bunzel, M., Henry, A., Kohli, A., and Riemann, M.** (2017). Physiological and proteomic analysis of the rice mutant *cpm2* suggests a negative regulatory role of jasmonic acid in drought tolerance. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Dietrich, D.** (2018). Hydrotropism: How roots search for water. *J. Exp. Bot.* **69**: 2759–2771.
- Dong, W., Li, D.L., Qiu, N.W., and Song, Y.G.** (2018). The functions of plant cation/proton antiporters. *Biol.*

Plant. **62**: 421–427.

Dong, X., Gao, Y., Chen, W., Wang, W., Gong, L., Liu, X., and Luo, J. (2015). Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice. *Mol. Plant* **8**: 111–121.

Du, H., Liu, H., and Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* **4**: 1–10.

Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., and Mueller, M.J. (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: Redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiol.* **153**: 114–127.

Escande, F. and Rouleau, E. (2015). Nomenclature des variations de séquence en génétique : applications en génétique somatique. **IV**: 119–124.

Eva van, Z., Yanxia, Z., and Christa, T. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants.

Fahad, S. et al. (2018). Major constraints for global rice production (Elsevier Inc.).

Fang, C.Y. et al. (2016). Control of Leaf Senescence by an MeOH-Jasmonates Cascade that Is Epigenetically Regulated by OsSRT1 in Rice. *Mol. Plant* **9**: 1366–1378.

FAO (2022). Food Outlook.

FAO, ITPS, and GSP (2021). Global map of salt-affected soils: GSASmap V1.0.: 20.

Farhangi-AbRiz, S. and Ghassemi-Golezani, K. (2018). How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**: 1010–1016.

Farmer, E.E. and Ryan, C.A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 7713–7716.

Feng, W. et al. (2018). The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. *Curr. Biol.* **72**: 2964–2979.

Feng, X., Zhang, L., Wei, X., Zhou, Y., Dai, Y., and Zhu, Z. (2020). OSJAZ13 negatively regulates jasmonate signaling and activates hypersensitive cell death response in rice. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 1–22.

Fernández-Calvo, P. et al. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715.

Fernández-Milmanda, G.L. et al. (2020). A light-dependent molecular link between competition cues and defence

- responses in plants. *Nat. Plants* **6**: 223–230.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751–759.
- Flockerzi, V.** (2008). Non-selective Cation Channels. *Encycl. Mol. Pharmacol.* **54**: 679–684.
- Foley, D.J., Thenkabail, P.S., Aneece, I.P., Teluguntla, P.G., and Oliphant, A.J.** (2020). A meta-analysis of global crop water productivity of three leading world crops (wheat, corn, and rice) in the irrigated areas over three decades. *Int. J. Digit. Earth* **13**: 939–975.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Hara, N., Toki, S., and Tanaka, Y.** (2011). Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na⁺/H⁺ antiporter genes. *Planta* **233**: 175–188.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., and Tanaka, Y.** (2004). Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter from Rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 146–159.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.M., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C.** (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* **4**: 112–166.
- Garcia-Abellan, J.O., Fernandez-Garcia, N., Lopez-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F.B., Angosto, T., Capel, J., Lozano, R., Pineda, B., Moreno, V., Olmos, E., and Bolarin, M.C.** (2015). The tomato res mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiol. Plant.* **155**: 296–314.
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., and Varin, L.** (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **278**: 17895–17900.
- Grattan, S.R., Shannon, M.C., and Roberts, S.R.** (2002). Field study with metallic rings.: 189–195.
- Guo, Q., Major, I.T., and Howe, G.A.** (2018). Resolution of growth–defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **44**: 72–81.
- Gupta, P. and De, B.** (2017). Metabolomics analysis of rice responses to salinity stress revealed elevation of serotonin, and gentisic acid levels in leaves of tolerant varieties. *Plant Signal. Behav.* **12**: 1–11.
- Haga, K. and Iino, M.** (2004). Phytochrome-Mediated Transcriptional Up-regulation of ALLENE OXIDE SYNTHASE in Rice Seedlings. *Plant Cell Physiol.* **45**: 119–128.
- Haga, K., Kiyota, S., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Takano, M., and Iino, M.** (2008). Functional analysis of a rice allene oxide synthase gene (OsAOS1) that functions for jasmonate biosynthesis. In *Plant and Cell Physiology*.

- Hagel, J.M. and Facchini, P.J.** (2018). Expanding the roles for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases in plant metabolism. *Nat. Prod. Rep.* **35**: 721–734.
- Hakata, M., Kuroda, M., Ohsumi, A., Hirose, T., Nakamura, H., Muramatsu, M., Ichikawa, H., and Yamakawa, H.** (2012). Overexpression of a rice TIFY gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 2129–34.
- Haroth, S., Feussner, K., Kelly, A.A., Zienkiewicz, K., Shaikhqasem, A., Herrfurth, C., and Feussner, I.** (2019). The glycosyltransferase UGT76E1 significantly contributes to 12-O-glucopyranosyl-jasmonic acid formation in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves. *J. Biol. Chem.* **294**: 9858–9872.
- Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P., and Riemann, M.** (2015). Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *J. Exp. Bot.* **66**: 3339–3352.
- Hazman, M., Sühnel, M., Schäfer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., Marquis, V., Herrgott, L., Miesch, L., Riemann, M., and Heitz, T.** (2019). Characterization of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) Hormonal Catabolic Pathways in Rice upon Wounding and Salt Stress. *Rice* **12**.
- He, Y. et al.** (2020). The osgsk2 kinase integrates brassinosteroid and jasmonic acid signaling by interacting with osjaz4[open]. *Plant Cell* **32**: 2806–2822.
- He, Y., Zhang, H., Sun, Z., Li, J., Hong, G., Zhu, Q., Zhou, X., MacFarlane, S., Yan, F., and Chen, J.** (2017). Jasmonic acid-mediated defense suppresses brassinosteroid-mediated susceptibility to Rice black streaked dwarf virus infection in rice. *New Phytol.* **214**: 388–399.
- Heitz, T.** (2021). Lipids | Jasmonate Metabolism: Shaping Signals for Plant Stress Adaptation and Development. *Encycl. Biol. Chem.* **2**: 790–803.
- Heitz, T., Smirnova, E., Marquis, V., and Poirier, L.** (2019). Metabolic Control within the Jasmonate Biochemical Pathway. *Plant Cell Physiol.* **60**: 2621–2628.
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F., and Ménard, R.** (2016). The Rise and Fall of Jasmonate Biological Activities. *Lipids Plant Algae Dev.* **86**: 405–426.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., and Pinot, F.** (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J. Biol. Chem.* **287**: 6296–306.
- Hiei, Y. and Komari, T.** (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat. Protoc.* **3**: 824–834.
- Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M.C., Kanygin, A., Redding, K.E., and Chandrasekhar, T.** (2016).

- Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environ. Exp. Bot.* **124**: 39–63.
- Hong, Y. et al.** (2018). Premature leaf senescence 3, encoding a methyltransferase, is required for melatonin biosynthesis in rice. *Plant J.* **95**: 877–891.
- Horie, T., Karahara, I., and Katsuhara, M.** (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* **5**: 1–18.
- Hossain, M.S. and Dietz, K.J.** (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Hou, X., Ding, L., and Yu, H.** (2013). Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. *Plant Cell Rep.* **32**: 1067–1074.
- Howe, G.A., Major, I.T., and Koo, A.J.** (2018). Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 387–415.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F., and Yu, D.** (2013). Jasmonate regulates the INDUCER OF CBF expression-C-repeat binding factor/dre binding factor1 Cascade and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2907–2924.
- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., and Yu, D.** (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: Crosstalk with other phytohormones. *J. Exp. Bot.* **68**: 1361–1369.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Lan, H., Sun, H., Wang, Z., Bao, Y., Wang, J., Tang, H., and Zhang, H.** (2012). A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **80**: 337–350.
- Huang, J., Yang, X., Wang, M.M., Tang, H.J., Ding, L.Y., Shen, Y., and Zhang, H.S.** (2007). A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1769**: 220–227.
- Huang, Y. et al.** (2019). OsNCED5, a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene, regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice. *Plant Sci.* **287**: 110188.
- Huang, Y., Guo, Y., Liu, Y., Zhang, F., Wang, Z., Wang, H., Wang, F., Li, D., Mao, D., Luan, S., Liang, M., and Chen, L.** (2018). 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase 3 Regulates Plant Growth and Enhances Multi-Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Front. Plant Sci.* **9**.
- Hussain Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A., and Iqbal Mir, J.** (2013). Compatible Solute Engineering in Plants for Abiotic Stress Tolerance - Role of Glycine Betaine. *Curr. Genomics* **14**: 157–165.
- Incarbone, M., Clavel, M., Monsion, B., Kuhn, L., Scheer, H., Vantard, É., Poignavent, V., Dunoyer, P., Genschik, P., and Ritzenthaler, C.** (2021). Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into

- Tobacco rattle virus replication complexes and reveals Arabidopsis DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector. *Plant Cell* **33**: 3402–3420.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K.** (2001). The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2191–2209.
- Islam, S., Leissing, T.M., Chowdhury, R., Hopkinson, R.J., and Schofield, C.J.** (2018). Oxygenases.: 1–36.
- Jabnourne, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.L., Conéjéro, G., Rodríguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdelly, C., and Véry, A.A.** (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the Rice HKT transporter family. *Plant Physiol.* **150**: 1955–1971.
- Jain, R. et al.** (2019). Genome sequence of the model rice variety KitaakeX. bioRxiv: 1–9.
- Jiang, Z. et al.** (2019). Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. *Nature*.
- Jimenez-Aleman, G.H., Almeida-Trapp, M., Fernández-Barbero, G., Gimenez-Ibanez, S., Reichelt, M., Vadassery, J., Mithöfer, A., Caballero, J., Boland, W., and Solano, R.** (2019). Omega hydroxylated JA-Ile is an endogenous bioactive jasmonate that signals through the canonical jasmonate signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**: 158520.
- Kaddah, M.T.** (1963). salinity effects on growth at the seedling and inflorescence stages of development. *Soil Sci.* **96**: 105–111.
- Kang, J.H., Wang, L., Giri, A., and Baldwin, I.T.** (2006). Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell* **18**: 3303–3320.
- Kang, J.S. et al.** (2008). Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2008) 105, 15 (5933-5938) DOI: 10.1073/pnas.0800237105). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 7893.
- Kashihara, K., Onohata, T., Okamoto, Y., Uji, Y., Mochizuki, S., Akimitsu, K., and Gomi, K.** (2019). Overexpression of OsNINJA1 negatively affects a part of OsMYC2-mediated abiotic and biotic responses in rice. *J. Plant Physiol.* **232**: 180–187.
- Kawahara, Y. et al.** (2013). Improvement of the *oryza sativa nipponbare* reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* **6**: 3–10.
- Kawai, Y., Ono, E., and Mizutani, M.** (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J.* **78**: 328–343.

- Kim** (2011). Guard Cell Signal Transduction Network.: 561–591.
- Kim, J.M. et al.** (2017). Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nat. Plants* **3**: 4–10.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., and Matsuura, H.** (2011). Arabidopsis CYP94B3 Encodes Jasmonyl-L-Isoleucine 12-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Jasmonate. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1757–1765.
- Koch, T., Bandemer, K., and Boland, W.** (1997). Biosynthesis of cis-Jasmone: A Pathway for the Inactivation and the Disposal of the Plant Stress Hormone Jasmonic Acid to the Gas Phase? *Helv. Chim. Acta* **80**: 838–850.
- Kong, Z., Li, M., Yang, W., Xu, W., and Xue, Y.** (2006). A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol.* **141**: 1376–1388.
- Koo, A.J.K., Cooke, T.F., and Howe, G.A.** (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 9298–9303.
- Koo, A.J.K., Thireault, C., Zemelis, S., Poudel, A.N., Zhang, T., Kitaoka, N., Brandizzi, F., Matsuura, H., and Howe, G.A.** (2014). Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **289**: 29728–29738.
- Kosar, F., Akram, N.A., Sadiq, M., Al-Qurainy, F., and Ashraf, M.** (2019). Trehalose: A Key Organic Osmolyte Effectively Involved in Plant Abiotic Stress Tolerance. *J. Plant Growth Regul.* **38**: 606–618.
- Krishnan, A. et al.** (2009). Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol.* **149**: 165–170.
- Kronzucker, H.J. and Britto, D.T.** (2011). Sodium transport in plants: A critical review. *New Phytol.* **189**: 54–81.
- Kuroda, H., Oshima, T., Kaneda, H., and Takashio, M.** (2005). Identification and functional analyses of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1545–1554.
- Kurotani, K.-I., Hattori, T., and Takeda, S.** (2015a). Overexpression of a CYP94 family gene CYP94C2b increases internode length and plant height in rice. *Plant Signal. Behav.* **10**: e1046667.
- Kurotani, K., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H., Ishimaru, Y., Tashita, R., Suzuki, T., Ueda, M., Hattori, T., and Takeda, S.** (2015b). Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol.* **56**: 779–89.
- Kurotani, K., Yamanaka, K., Toda, Y., Ogawa, D., Tanaka, M., Kozawa, H., Nakamura, H., Hakata, M., Ichikawa, H., Hattori, T., and Takeda, S.** (2015c). Stress Tolerance Profiling of a Collection of Extant Salt-Tolerant Rice Varieties and Transgenic Plants Overexpressing Abiotic Stress Tolerance Genes. *Plant Cell Physiol.* **56**: 1867–1876.

- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J., and Leigh, R.A.** (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* **32**: 139–149.
- Lee, H.Y., Seo, J.S., Cho, J.H., Jung, H., Kim, J.K., Lee, J.S., Rhee, S., and Do Choi, Y.** (2013). *Oryza sativa* COI Homologues Restore Jasmonate Signal Transduction in *Arabidopsis coi1-1* Mutants. *PLoS One* **8**: 1–9.
- Lee, S.H., Sakuraba, Y., Lee, T., Kim, K.W., An, G., Lee, H.Y., and Paek, N.C.** (2015). Mutation of *Oryza sativa* CORONATINE INSENSITIVE 1b (OsCOI1b) delays leaf senescence. *J. Integr. Plant Biol.* **57**: 562–576.
- Li, G. et al.** (2017). The sequences of 1504 mutants in the model rice variety kitaake facilitate rapid functional genomic studies. *Plant Cell* **29**: 1218–1231.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., and Howe, G.A.** (2004). The Tomato Homolog of Coronatine-Insensitive1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *Plant Cell* **16**: 126–143.
- Li, X. and Zhang, W.S.** (2008). Salt-avoidance tropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **3**: 351–353.
- Liang, C., Zheng, G., Li, W., Wang, Y., Hu, B., Wang, H., Wu, H., Qian, Y., Zhu, X.G., Tan, D.X., Chen, S.Y., and Chu, C.** (2015). Melatonin delays leaf senescence and enhances salt stress tolerance in rice. *J. Pineal Res.* **59**: 91–101.
- Liao, L., Shi, C.H., Zeng, D.D., Jin, X.L., and Wu, J.G.** (2014). Morphogenesis and Molecular Basis on the Unclosed Glumes, a Novel Mutation Related to the Floral Organ of Rice. *Plant Mol. Biol. Report.* **33**: 480–489.
- Liao, Z., Wang, L., Li, C., Cao, M., Wang, J., Yao, Z., Zhou, S., Zhou, G., Zhang, D., and Lou, Y.** (2022). The lipoxygenase gene OsRCL1 is involved in the biosynthesis of herbivore-induced JAs and regulates plant defense and growth in rice. *Plant. Cell Environ.*: 1–14.
- Lim, C., Kang, K., Shim, Y., Sakuraba, Y., An, G., and Paek, N.C.** (2020). Rice ETHYLENE RESPONSE FACTOR 101 Promotes Leaf Senescence Through Jasmonic Acid-Mediated Regulation of OsNAP and OsMYC2. *Front. Plant Sci.* **11**: 1–12.
- Lin, H.X., Zhu, M.Z., Yano, M., Gao, J.P., Liang, Z.W., Su, W.A., Hu, X.H., Ren, Z.H., and Chao, D.Y.** (2004). QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 253–260.
- Lonergan, P.F., Pallotta, M.A., Lorimer, M., Paull, J.G., Barker, S.J., and Graham, R.D.** (2009). Multiple genetic loci for zinc uptake and distribution in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* **184**: 168–179.
- Lu, Z., Liu, D., and Liu, S.** (2007). Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **26**: 1909–1917.

- Luo, X., Wu, J., Li, Y., Nan, Z., Guo, X., Wang, Y., Zhang, A., Wang, Z., Xia, G., and Tian, Y.** (2013). Synergistic Effects of GhSOD1 and GhCAT1 Overexpression in Cotton Chloroplasts on Enhancing Tolerance to Methyl Viologen and Salt Stresses. *PLoS One* **8**.
- Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J.** (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *J. Exp. Bot.* **46**: 1843–1852.
- Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J.** (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* **78**: 389–398.
- Mahi, H. El et al.** (2019). A critical role of sodium flux via the plasma membrane na^+/h^+ exchanger *sos1* in the salt tolerance of rice. *Plant Physiol.* **180**: 1046–1065.
- Mahmud, S., Ullah, C., Kortz, A., Bhattacharyya, S., Yu, P., Gershenzon, J., and Vothknecht, U.C.** (2022). Constitutive expression of JASMONATE RESISTANT 1 induces molecular changes that prime the plants to better withstand drought.: 1–17.
- Mao, D. et al.** (2019). Natural variation in the HAN1 gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**: 3494–3501.
- Mao, D., Xin, Y., Tan, Y., Hu, X., Bai, J., Liu, Z., Yu, Y., and Li, L.** (2018). Natural variation in the HAN1 gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate.: 1–8.
- Marquis, V.** (2020). L'homéostasie catabolique des jasmonates et son impact sur la signalisation des réponses aux stress chez *Arabidopsis thaliana*.
- Marquis, V., Smirnova, E., Graindorge, S., Delcros, P., Villette, C., Zumsteg, J., Heintz, D., and Heitz, T.** (2022). Broad-spectrum stress tolerance conferred by suppressing jasmonate signaling attenuation in *Arabidopsis* JASMONIC ACID OXIDASE mutants. *Plant J.* **109**: 856–872.
- Marquis, V., Smirnova, E., Poirier, L., Zumsteg, J., Schweizer, F., Reymond, P., and Heitz, T.** (2020). Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance. *Plant Cell Environ.* **43**: 1558–1570.
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M., and Quintero, F.J.** (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.* **143**: 1001–1012.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E.P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J.I., and Uozumi, N.** (2002). Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 6428–6433.
- Matsumoto, T. et al.** (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793–800.

- Matthes, M.C., Bruce, T.J.A., Ton, J., Verrier, P.J., Pickett, J.A., and Napier, J.A.** (2010). The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta* **232**: 1163–1180.
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G., and Yang, Y.** (2006). Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1127–1137.
- Miersch, O., GUNTHER, T., FRITSCH, W., and SEMBDNER, G.** (1993). Jasmonates From Different Fungal Species. *Nat. Prod. Lett.* **2**: 293–299.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C.** (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* **177**: 114–127.
- Miller, G., Suzuki, N., CIFTCI-YILMAZ, S., and MITTLER, R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* **33**: 453–467.
- Mohamed, H.I. and Latif, H.H.** (2017). Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **23**: 545–556.
- Monte, I. et al.** (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nat. Chem. Biol.* **14**: 480–488.
- Monte, I., Kneeshaw, S., Franco-Zorrilla, J.M., Chini, A., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., and Solano, R.** (2020). An Ancient COI1-Independent Function for Reactive Electrophilic Oxylipins in Thermotolerance. *Curr. Biol.* **30**: 962-971.e3.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 651–681.
- Nadarajah, K., Abdul Hamid, N.W., and Abdul Rahman, N.S.N.** (2021). SA-mediated regulation and control of abiotic stress tolerance in rice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., and Fujita, M.** (2015). Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*.
- Nakamura, Y., Mithöfer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., and Ueda, M.** (2011). 12-hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol.* **155**: 1226–1236.
- Ndiaye, A., Diallo, A.O., Fall, N.C., Diouf, R.D., Diouf, D., and Kane, N.A.** (2022). Transcriptomic analysis of methyl jasmonate treatment reveals gene networks involved in drought tolerance in pearl millet. *Sci. Rep.* **12**: 1–13.

- Nguyen, N. V.** (2005). Global climate changes and rice food security. *Delta*: 24–30.
- Nguyen, T.H.** (2018). THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L ' UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER Présentée par NGUYEN Trang Hieu.
- Nguyen, T.H., Goossens, A., and Lacchini, E.** (2022). Jasmonate: A hormone of primary importance for plant metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*
- Nguyen, T.H., Mai, H.T.T., Moukouanga, D., Lebrun, M., Bellafiore, S., and Champion, A.** (2019a). CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing of the Jasmonate Biosynthesis OsAOC Gene in Rice. *Methods Mol. Biol.*
- Nguyen, T.H., To, H.T.M., Lebrun, M., Bellafiore, S., and Champion, A.** (2019b). Jasmonates—the Master Regulator of Rice Development, Adaptation and Defense. *Plants* 2019, Vol. 8, Page 339 **8**: 339.
- Noir, S., Bömer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T.L., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K., and Devoto, A.** (2013). Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiol.* **161**: 1930–1951.
- O'Toole, J.C. and Cruz, R.T.** (1980). Response of Leaf Water Potential, Stomatal Resistance, and Leaf Rolling to Water Stress. *Plant Physiol.* **65**: 428–432.
- O'Toole, J.C. and Moya, T.B.** (1978). Genotypic Variation in Maintenance of Leaf Water Potential in Rice 1. *Crop Sci.* **18**: 873–876.
- Odegard, I., Bijleveld, M., and Naber, N.** (2015). Food Commodity Footprints, Global GHG footprints and water scarcity footprints in agriculture.
- OECD-FAO** (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030.
- Ou, S.H.** (1985). Rice Diseases. Commonw. Mycol. Inst. **2nd editio.**
- Pandey, B.K., Verma, L., Prusty, A., Singh, A.P., Bennett, M.J., Tyagi, A.K., Giri, J., and Mehra, P.** (2021). OsJAZ11 regulates phosphate starvation responses in rice. *Planta* **254**: 1–16.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., and Quintero, F.J.** (2006). Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance. In *Journal of Experimental Botany*, pp. 1181–1199.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* **31**: 1–12.
- Passioura, J.B.** (1982). Water in the Soil-Plant-Atmosphere Continuum. *Physiol. Plant Ecol.* II: 5–33.
- Patkar, R.N., Benke, P.I., Qu, Z., Constance Chen, Y.Y., Yang, F., Swarup, S., Naqvi, N.I., Chen, Y.Y.C.,**

- Yang, F., Swarup, S., and Naqvi, N.I.** (2015). A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. *Nat. Chem. Biol.* **11**: 733–740.
- Pauwels, L. et al.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788–791.
- Pauwels, L. et al.** (2015). The RING E3 ligase KEEP ON GOING modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 stability. *Plant Physiol.* **169**: 1405–1417.
- Pauwels, L. and Goossens, A.** (2011). The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**: 3089–3100.
- Platten, J.D. et al.** (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.*
- Ponce, K.S., Guo, L., Leng, Y., Meng, L., and Ye, G.** (2021). Molecular Sciences Advances in Sensing, Response and Regulation Mechanism of Salt Tolerance in Rice. *Int. J. Mol. Sci.*
- Poudel, A.N., Holtsclaw, R.E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., Lei, Z., Sumner, L.W., Singh, K., Matsuura, H., and Koo, A.J.K.** (2019). 12-Hydroxy-Jasmonoyl-l-Isoleucine Is an Active Jasmonate That Signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and Contributes to the Wound Response in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*
- Pratiwi, P., Tanaka, G., Takahashi, T., Xie, X., Yoneyama, K., Matsuura, H., and Takahashi, K.** (2017). Identification of jasmonic acid and jasmonoyl-isoleucine, and characterization of AOS, AOC, OPR and JAR1 in the model lycophyte *Selaginella moellendorffii*. *Plant Cell Physiol.* **58**: 789–801.
- Qi, J., Li, J., Han, X., Li, R., Wu, J., Yu, H., Hu, L., Xiao, Y., Lu, J., and Lou, Y.** (2016). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase regulates development and herbivory-induced defense response in rice. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 564–576.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K.** (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8436–8441.
- Qiu, Z.B., Guo, J.L., Zhu, A.J., Zhang, L., and Zhang, M.M.** (2014). Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **104**: 202–208.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H.Z., Zhu, J.K., and Pardo, J.M.** (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Reddy, I.N.B.L., Kim, B.K., Yoon, I.S., Kim, K.H., and Kwon, T.R.** (2017). Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. *Rice Sci.* **24**: 123–144.

- Ren, Z.H., Gao, J.P., Li, L.G., Cai, X.L., Huang, W., Chao, D.Y., Zhu, M.Z., Wang, Z.Y., Luan, S., and Lin, H.X.** (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* **37**: 1141–1146.
- Rensink, W.A. and Buell, C.R.** (2004). Arabidopsis to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species. *Plant Physiol.* **135**: 622–629.
- Reymond, P. and Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 404–411.
- Rhodes, D. and Rich, P.J.** (2002). Chapter 9 Salinity , Osmolytes and Compatible Solutes. *Molecules*: 181–204.
- Riemann, M. et al.** (2013). Identification of rice *Allene Oxide Cyclase* mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *Plant J.* **74**: 226–238.
- Riemann, M., Muller, A., Korte, A., Furuya, M., Weiler, E.W., and Nick, P.** (2003). Impaired induction of the jasmonate pathway in the rice mutant hebiba. *Plant Physiol.* **133**: 1820–30.
- Riemann, M., Riemann, M., and Takano, M.** (2008). Rice JASMONATE RESISTANT 1 is involved in phytochrome and jasmonate signalling. *Plant, Cell Environ.* **31**: 783–792.
- Rivandi, J., Miyazaki, J., Hrmova, M., Pallotta, M., Tester, M., and Collins, N.C.** (2011). A SOS3 homologue maps to HvNax4, a barley locus controlling an environmentally sensitive Na⁺ exclusion trait. *J. Exp. Bot.* **62**: 1201–1216.
- Rodríguez-Navarro, A. and Rubio, F.** (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 1149–1160.
- Saier Jr, M.H.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354.
- Santner, A. and Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071–1078.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A.** (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* **3**: 430–439.
- Schaller, A. and Stintzi, A.** (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532–1538.
- Schnee, C., Köllner, T.G., Held, M., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J., and Degenhardt, J.** (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1129–1134.

- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y. Do** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 4788–4793.
- Seo, J.S., Joo, J., Kim, M.J., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Song, S.I., Cheong, J.J., Lee, J.S., Kim, J.K., and Choi, Y. Do** (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J.* **65**: 907–921.
- Seong, S.Y., Shim, J.S., Bang, S.W., and Kim, J.K.** (2020). Overexpression of *osc3h10*, a czech-zinc finger, improves drought tolerance in rice by regulating stress-related genes. *Plants* **9**: 1–16.
- Shannon, M.C.** (1997). Adaptation of Plants to Salinity. *Adv. Agron.* **60**: 75–120.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., and Zhu, J.K.** (2002). The putative plasma membrane NA^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance NA^+ transport in plants. *Plant Cell*.
- Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Okada, K., Nojiri, H., and Yamane, H.** (2012). Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *J. Biol. Chem.* **287**: 19315–19325.
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Ménard, R., Miesch, L., and Heitz, T.** (2017). Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection. *Mol. Plant* **10**: 1159–1173.
- Solis, C.A., Yong, M.T., Venkataraman, G., Milham, P., Zhou, M., Shabala, L., Holford, P., Shabala, S., and Chen, Z.H.** (2021). Sodium sequestration confers salinity tolerance in an ancestral wild rice. *Physiol. Plant.* **172**: 1594–1608.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 6837–6840.
- Staswick, P.E. and Tiryaki, I.** (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117–2127.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., and Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405–1415.
- Stuhlfelder, C., Mueller, M.J., and Warzecha, H.** (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2976–2983.
- Stumpe, M., Göbel, C., Faltin, B., Beike, A.K., Hause, B., Himmelsbach, K., Bode, J., Kramell, R., Wasternack, C., Frank, W., Reski, R., and Feussner, I.** (2010). The moss *Physcomitrella patens* contains cyclopentenones but no jasmonates: Mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered

- sporophyte morphology. *New Phytol.* **188**: 740–749.
- Su, C.F., Wang, Y.C., Hsieh, T.H., Lu, C.A., Tseng, T.H., and Yu, S.M.** (2010). A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.* **153**: 145–158.
- Sunarpi et al.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**: 928–938.
- Suza, W.P., Rowe, M.L., Hamberg, M., and Staswick, P.E.** (2010). A tomato enzyme synthesizes (+)-7-isojasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* **231**: 717–728.
- Suzuki, K. et al.** (2016). OsHKT1;4-mediated Na⁺ transport in stems contributes to Na⁺ exclusion from leaf blades of rice at the reproductive growth stage upon salt stress. *BMC Plant Biol.* **16**: 1–15.
- Svyatyna, K., Jikumaru, Y., Brendel, R., Reichelt, M., Mithöfer, A., Takano, M., Kamiya, Y., Nick, P., and Riemann, M.** (2014). Light induces jasmonate-isoleucine conjugation via OsJAR1-dependent and -independent pathways in rice. *Plant, Cell Environ.* **37**: 827–839.
- Tahjib-Ul-Arif, M. et al.** (2021). Citric acid-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 7235.
- Tamogami, S., Rakwal, R., and Agrawal, G.K.** (2008). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**: 723–727.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S.** (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 3022–3027.
- Tang, G., Ma, J., Hause, B., Nick, P., and Riemann, M.** (2020a). Jasmonate is required for the response to osmotic stress in rice. *Environ. Exp. Bot.* **175**: 104047.
- Tang, J., Yang, D., Wu, J., Chen, S., and Wang, L.** (2020b). Silencing JA hydroxylases in *Nicotiana attenuata* enhances jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Spodoptera litura*. *Plant Divers.* **42**: 111–119.
- Tani, T., Sobajima, H., Okada, K., Chujo, T., Arimura, S.I., Tsutsumi, N., Nishimura, M., Seto, H., Nojiri, H., and Yamane, H.** (2008). Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* **227**: 517–526.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO11) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–5.
- To, H.T.M., Nguyen, H.T., Dang, N.T.M., Nguyen, N.H., Bui, T.X., Lavarenne, J., Phung, N.T.P., Gantet, P., Lebrun, M., Bellafiore, S., and Champion, A.** (2019). Unraveling the Genetic Elements Involved in Shoot and Root Growth Regulation by Jasmonate in Rice Using a Genome-Wide Association Study. *Rice* **12**.

- Toriyama, K., Heong, K.L., and Hardy, B.** (2005). Isbn 971-22-0204-6.
- Ueda, J. and Kato, J.** (1980). Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) . *Plant Physiol.* **66**: 246–249.
- Uji, Y., Akimitsu, K., and Gomi, K.** (2017). Identification of OsMYC2-regulated senescence-associated genes in rice. *Planta* **245**: 1241–1246.
- Uji, Y., Taniguchi, S., Tamaoki, D., Shishido, H., Akimitsu, K., and Gomi, K.** (2016). Overexpression of OsMYC2 results in the upregulation of early JA-responsive genes and bacterial blight resistance in rice. *Plant Cell Physioogy* **7**: 107–115.
- Um, T.Y., Lee, H.Y., Lee, S., Chang, S.H., Chung, P.J., Oh, K.B., Kim, J.K., Jang, G., and Choi, Y. Do** (2018). Jasmonate zim-domain protein 9 interacts with slender rice 1 to mediate the antagonistic interaction between jasmonic and gibberellic acid signals in rice. *Front. Plant Sci.* **871**: 1–11.
- Valea, I. et al.** (2021). The rice wound-inducible transcription factor RERJ1 sharing same signal transduction pathway with OsMYC2 is necessary for defense response to herbivory and bacterial blight. *Plant Mol. Biol.*
- Valegård, K., Van Terwisscha Scheltinga, A.C., Lloyd, M.D., Hara, T., Ramaswamy, S., Perrakis, A., Thompson, A., Lee, H.J., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., Hajdu, J., and Andersson, I.** (1998). Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394**: 805–809.
- Valenzuela, C.E., Acevedo-Acevedo, O., Miranda, G.S., Vergara-Barros, P., Holuigue, L., Figueroa, C.R., and Figueroa, P.M.** (2016). Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in *Arabidopsis* primary root. *J. Exp. Bot.* **67**: 4209–4220.
- Verma, D., Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, N., and Sinha, A.K.** (2019). A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in *Arabidopsis*. *FEBS J.*
- Vick, B.A. and Zimmerman, D.C.** (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 470–477.
- Waese, J. et al.** (2017). ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell* **29**: 1806–1821.
- Wakuta, S., Suzuki, E., Saburi, W., Matsuura, H., Nabeta, K., Imai, R., and Matsui, H.** (2011). OsJAR1 and OsJAR2 are jasmonyl-l-isoleucine synthases involved in wound- and pathogen-induced jasmonic acid signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**: 634–639.
- Wang, F., Guo, Z., Li, H., Wang, M., Onac, E., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., and Zhou, Y.** (2016). Phytochrome a and b function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling[OPEN]. *Plant Physiol.* **170**: 459–471.

- Wang, R., Jing, W., Xiao, L., Jin, Y., Shen, L., and Zhang, W.** (2015). The rice high-affinity potassium transporter is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-type transcription factor. *Plant Physiol.* **168**: 1076–1090.
- Wang, X., Li, Q., Xie, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., and Jiang, D.** (2021a). Abscisic acid and jasmonic acid are involved in drought priming-induced tolerance to drought in wheat. *Crop J.* **9**: 120–132.
- Wang, Y., Huang, L., Du, F., Wang, J., Zhao, X., Li, Z., Wang, W., Xu, J., and Fu, B.** (2021b). Comparative transcriptome and metabolome profiling reveal molecular mechanisms underlying OsDRAP1-mediated salt tolerance in rice. *Sci. Rep.* **11**: 1–11.
- Wang, Y., Li, D., Gao, J., Li, X., Zhang, R., Jin, X., Hu, Z., Zheng, B., Persson, S., and Chen, P.** (2017). The 2'-O-methyladenosine nucleoside modification gene OsTRM13 positively regulates salt stress tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* **68**: 1479–1491.
- Wang, Y., Reiter, R.J., and Chan, Z.** (2018). Phyto melatonin: A universal abiotic stress regulator. *J. Exp. Bot.* **69**: 963–974.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**: 1021–1058.
- Wasternack, C. and Song, S.** (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* **68**: 1303–1321.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., and Miersch, O.** (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* **163**: 297–306.
- Wasternack, C. and Strnad, M.** (2018). Jasmonates: News on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1–26.
- Weber, H., Vick, B.A., and Farmer, E.E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 10473–10478.
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., and Heitz, T.** (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* **288**: 31701–31714.
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., and Heitz, T.** (2016). Dynamics of jasmonate metabolism upon flowering and across leaf stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **5**: 539–547.
- Wu, H., Ye, H., Yao, R., Zhang, T., and Xiong, L.** (2015). OsJAZ9 acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice. *Plant Sci.* **232**: 1–12.

- Xie, D., Feys, B.F., James, S., Nieto-rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 279.
- Xie, K., Minkenberg, B., and Yang, Y.** (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 3570–3575.
- Yamada, S., Kano, A., Tamaoki, D., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., and Gomi, K.** (2012). Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant Cell Physiol.* **53**: 2060–2072.
- Yamamoto, Y., Ohshika, J., Takahashi, T., Ishizaki, K., Kohchi, T., Matusuura, H., and Takahashi, K.** (2015). Functional analysis of allene oxide cyclase, MpAOC, in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* **116**: 48–56.
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F., and Xie, D.** (2016). Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* **172**: 2154–2164.
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., and Wang, C.** (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* **10**: 1–12.
- Yang, N., Zhang, Y., Chen, L., Wang, W., Liu, R., Gao, R., Zhou, Y., and Li, H.** (2021). G protein and PLD δ are involved in JA to regulate osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Reports* **26**: 100952.
- Ye, H., Du, H., Tang, N., Li, X., and Xiong, L.** (2009). Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. *Plant Mol. Biol.* **71**: 291–305.
- Yeo, A.R. and Flowers, T.J.** (1983). Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiol. Plant.* **59**: 189–195.
- Yeo, A.R., Lee, A.S., Izard, P., Boursier, P.J., and Flowers, T.J.** (1991). Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **42**: 881–889.
- Yu, Y., Lv, Y., Shi, Y., Li, T., Chen, Y., Zhao, D., and Zhao, Z.** (2018). The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules* **23**: 1–15.
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z., and Xia, G.** (2020). How Plant Hormones Mediate Salt Stress Responses. *Trends Plant Sci.*: 1–14.
- Yuan, F. et al.** (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*.

- Yuan, J.S., Köllner, T.G., Wiggins, G., Grant, J., Degenhardt, J., and Chen, F.** (2008). Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. *Plant J.* **55**: 491–503.
- Yuan, S. et al.** (2021). Sustainable intensification for a larger global rice bowl. *Nat. Commun.* **12**.
- Zeng, L. and Shannon, M.C.** (2000). Salinity effects on seedling growth and yield components of different inbred rice lines. *Crop Sci.* **37**: 131–139.
- Zeng, L., Shannon, M.C., and Lesch, S.M.** (2001). Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. *Agric. Water Manag.* **48**: 191–206.
- Zhai, Y., Wen, Z., Fang, W., Wang, Y., Xi, C., Liu, J., Zhao, H., Wang, Y., and Han, S.** (2021). Functional analysis of rice OSCA genes overexpressed in the arabidopsis *osca1* mutant due to drought and salt stresses. *Transgenic Res.* **30**: 811–820.
- Zhai, Y., Wen, Z., Han, Y., Zhuo, W., Wang, F., Xi, C., Liu, J., Gao, P., Zhao, H., Wang, Y., Wang, Y., and Han, S.** (2020). Heterogeneous expression of plasma-membrane-localised OsOSCA1.4 complements osmotic sensing based on hyperosmolality and salt stress in *Arabidopsis osca1* mutant. *Cell Calcium* **91**: 102261.
- Zhang, C. et al.** (2016a). Suppression of Jasmonic Acid-Mediated Defense by Viral-Inducible MicroRNA319 Facilitates Virus Infection in Rice. *Mol. Plant* **9**: 1302–1314.
- Zhang, M., Liang, X., Wang, L., Cao, Y., Song, W., Shi, J., Lai, J., and Jiang, C.** (2019). A HAK family Na⁺ transporter confers natural variation of salt tolerance in maize. *Nat. Plants* **5**: 1297–1308.
- Zhang, S.S., Sun, L., Dong, X., Lu, S.J., Tian, W., and Liu, J.X.** (2016b). Cellulose synthesis genes CESA6 and CSI1 are important for salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 623–626.
- Zhang, T., Poudel, A.N., Jewell, J.B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., and Koo, A.J.K.** (2016c). Hormone crosstalk in wound stress response: Woundinducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **67**: 2107–2120.
- Zhang, X., Wang, D., Elberse, J., Qi, L., Shi, W., Peng, Y.L., Schuurink, R.C., Van den Ackerveken, G., and Liu, J.** (2021). Structure-guided analysis of *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASE (JOX) 2 reveals key residues for recognition of jasmonic acid substrate by plant JOXs. *Mol. Plant* **14**: 820–828.
- Zhang, Z., Ren, J., Stammers, D.K., Baldwin, J.E., Marios, K., and Schofield, C.J.** (2000). Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 127–133.
- Zhou, G., Qi, J., Ren, N., Cheng, J., Erb, M., Mao, B., and Lou, Y.** (2009). Silencing OsHI-LOX makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder. *Plant J.* **60**: 638–648.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H., and Yang, B.** (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* **42**: 10903–10914.

- Zhou, Y., Huang, W., Liu, L., Chen, T., Zhou, F., and Lin, Y.** (2013). Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence. *BMC Plant Biol.* **13**: 1.
- Zhu, J.K., Liu, J., and Xiong, L.** (1998). Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181–1191.
- Zhu, T., Herrfurth, C., Xin, M., Savchenko, T., Feussner, I., Goossens, A., and De Smet, I.** (2021). Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth. *Nat. Commun.* **12**: 1–8.
- Zhuo, M., Sakuraba, Y., and Yanagisawa, S.** (2020). A Jasmonate-Activated MYC2-Dof2.1-MYC2 Transcriptional Loop Promotes Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **32**: 242–262.
- Zou, X., Liu, L., Hu, Z., Wang, X., Zhu, Y., Zhang, J., Li, X., Kang, Z., Lin, Y., and Yin, C.** (2021). The inhibition of rice seminal root growth by salt is mediated by ethylene-jasmonate interaction. *J. Exp. Bot.*: 1–17.

Etude des circuits de régulation des jasmonates dans l'adaptation du Riz aux stress environnementaux

Résumé français

Les jasmonates, initialement caractérisés comme régulateurs de la croissance et de réponses de défense contre les pathogènes, ont plus récemment été associés à la réponse à divers stress abiotiques. L'élucidation de mécanismes d'activation de cette voie hormonale pour l'établissement des réponses à ces processus biologiques est documentée principalement chez *Arabidopsis thaliana*. Ici nous avons mené une telle recherche chez le Riz (*Oryza sativa*), pour comprendre le métabolisme et la signalisation spécifique des JAs chez une céréale. Les résultats de ma thèse avancent la connaissance des fonctions des JAs chez le Riz. D'une part, ils démontrent la conservation de la voie catabolique JAO dans le contrôle du niveau basal de signalisation JAs, illustrent sa régulation des processus JAs-dépendants tels que la réponse à des stress abiotiques, et dévoilent une possible origine évolutive de l'activité JAO. D'autre part, les données transcriptomiques et métaboliques générées révèlent différentes cibles des JAs dans la réponse au sel, permettant d'expliquer les rôles très opposés des JAs dans la tolérance aux composantes osmotique et ionique du stress salin.

Mots clés : Riz, jasmonates, métabolisme, stress salin, RNAseq

English summary

Jasmonates, initially characterized as regulators of growth and pathogen defense responses, have more recently been associated with the response to various abiotic stresses. Elucidation of the activation mechanisms of JAs signaling for the establishment of responses to these processes has been mainly performed in *Arabidopsis thaliana*. Here we undertook to investigate new aspects of JAs metabolism and signaling in the cereal rice (*Oryza sativa*). The results generated during my thesis advance our understanding of JA functions in rice. On the one hand, they demonstrate the conservation of the JA Oxidase catabolic pathway in rice in the control of the basal levels of JAs signaling, they illustrate its regulation of JAs-dependent processes as abiotic stress tolerance, and uncover a possible evolutionary origin of JAO activity. On the other hand, the transcriptomic and metabolic data we generated reveal different targets of JAs in the plant response to salt, making it possible to explain the very opposite roles of JAs in the tolerance of osmotic and ionic components of salt stress.

Key words: Rice, jasmonates, metabolism, salinity stress, RNAseq.